



Espacenet

Bibliographic data: JP2001524937 (A) — 2001-12-04

BIOCERAMIC COMPOSITIONS

Inventor(s):

Applicant(s):

international: A61F2/28; A61F2/30; A61K47/02;
A61K9/00; A61K9/20; A61L27/00;
A61L27/12; A61L27/38; A61L27/42;
A61L27/54; A61L27/58; A61F2/00;
A61F2/02; A61F2/46; (IPC1-
7): A61K47/02; A61K9/00; A61L27/00

- European: A61F2/28; A61F2/30C; A61K9/20H2;
A61L27/12; A61L27/38; A61L27/38B;
A61L27/38D2B; A61L27/38D2D;
A61L27/42E; A61L27/54; A61L27/58

Classification:

**Application
number:**

JP19980518524T 19971016

**Priority
number(s):**

US19960729342 19961016; US19960729354 19961016;
WO1997US18528 19971016

**Also published
as:**

JP4260891 (B2) WO9816209 (A2) WO9816209 (A3)
US6972130 (B1) ES2299183 (T3) more

Abstract not available for JP2001524937 (A)

Abstract of corresponding document: WO9816209 (A2)

The present invention provides a synthetic, poorly crystalline apatite (PCA) calcium phosphate containing a biologically active agent and/or cells (preferably tissue-forming or tissue-degrading cells). The compositions provided by the present invention are useful for a variety of in vivo and in vitro applications, including drug delivery (for example, to bony sites, the central nervous system, intramuscular sites, subcutaneous sites, interperitoneal sites, and ocular sites) tissue growth (preferably bone or cartilage) osseous augmentation, and methods of diagnosing disease states by assaying tissue forming potential of cells isolated from a host. The invention also provides methods of preparing delivery vehicles, of altering delivery vehicle characteristics, and of delivering biologically active agents to a site.; The invention further provides in vitro cell culture systems and cell encapsulation materials. The invention is useful for both medical and veterinary applications.

Last updated: 5.12.2011 Worldwide Database 5.7.31; 92p

B45

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号
特表2001-524937
(P2001-524937A)

(43) 公表日 平成13年12月4日 (2001.12.4)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	データベース* (参考)
A 6 1 K 9/00		A 6 1 K 9/00	
47/02		47/02	
A 6 1 L 27/00		A 6 1 L 27/00	U

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 139 頁)

(21) 出願番号 特願平10-518524
(86) (22) 出願日 平成9年10月16日 (1997.10.16)
(85) 翻訳文提出日 平成11年4月16日 (1999.4.16)
(86) 国際出願番号 P C T / U S 9 7 / 1 8 5 2 8
(87) 国際公開番号 W O 9 8 / 1 6 2 0 9
(87) 国際公開日 平成10年4月23日 (1998.4.23)
(31) 優先権主張番号 0 8 / 7 2 9 , 3 4 2
(32) 優先日 平成8年10月16日 (1996.10.16)
(33) 優先権主張国 米国 (U S)
(31) 優先権主張番号 0 8 / 7 2 9 , 3 5 4
(32) 優先日 平成8年10月16日 (1996.10.16)
(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 エテックス コーポレイション
アメリカ合衆国 02138 マサチューセッ
ツ, ケンブリッジ, シドニー ストリート
38
(72) 発明者 リー, ドースク ディー,
アメリカ合衆国 02146 マサチューセッ
ツ, ブルックライン, ロングウッド アベ
ニュー 50, アパートメント 518
(72) 発明者 レイ, クリスティアン
フランス国 エフ31320 カスタネ, オー
ルビル, リューディ レダム
(74) 代理人 弁理士 倉内 基弘 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生体セラミック組成物

(57) 【要約】

本発明は、生物学的に活性な薬剤及び/又は細胞 (好ましくは、組織形成性又は組織分解性細胞) を含有する合成の結晶性不良のアパタイト (P C A) リン酸カルシウム物質を提供する。本発明によって提供される組成物は、薬物送達 (例えば、骨性部位、中枢神経系部位、筋肉内部位、皮下部位、腹膜間部位、及び視覚部位へ)、組織成長 (好ましくは、骨又は軟骨)、骨増強を含む、種々のインビボ及びインビトロ用途、及び宿主から分離した細胞の組織形成性ポテンシャルをアセイすることによって疾患状態を診断する方法用に有用である。発明は、また、送達ビヒクルを調製する方法、送達ビヒクル特性を変更する方法、及び生物学的に活性な薬剤を部位に送達する方法も提供する。発明は、更にインビトロ細胞培養系及び細胞被包物質を提供する。発明は、医学的用途及び獣医学的用途の両方について有用である。

【特許請求の範囲】

1. 結晶性不良のアパタイト系（PCA）リン酸カルシウム及び生物学的活性物質を含む、生物学的活性物質を送達するためのビヒクル。
2. PCAリン酸カルシウムが実質的に図5dに示したX線回折図形を有する、請求項1記載のビヒクル。
3. PCAリン酸カルシウムが 26° 、 28.5° 、 32° 及び 33° の 2θ 値において広いピークを含むX線回折図形を有する、請求項1記載のビヒクル。
4. PCAリン酸カルシウムが約1.5より小さいカルシウム対リン酸比を有する、請求項1記載のビヒクル。
5. ビヒクルがPCAリン酸カルシウムを少なくとも1g含む場合にビヒクルをラットの筋肉内部位に置いた時にPCAリン酸カルシウムの少なくとも約80%が1年以内に再吸収されるようにPCAリン酸カルシウムが処方された、請求項1記載のビヒクル。
6. ビヒクルがPCAリン酸カルシウムを少なくとも1g含む場合にビヒクルをラットの筋肉内部位に置いた時にPCAリン酸カルシウムの少なくとも約80%が9か月以内に再吸収されるようにPCAリン酸カルシウムが処方された、請求項1記載のビヒクル。
7. ビヒクルがPCAリン酸カルシウムを少なくとも1g含む場合にビヒクルをラットの筋肉内部位に置いた時にPCAリン酸カルシウムの少なくとも約80%が6か月以内に再吸収されるようにPCAリン酸カルシウムが処方された、請求項1記載のビヒクル。
8. ビヒクルがPCAリン酸カルシウムを少なくとも1g含む場合にビヒクルをラットの筋肉内部位に置いた時にPCAリン酸カルシウムの少なくとも約80%が3か月以内に再吸収されるようにPCAリン酸カルシウムが処方された、請求項1記載のビヒクル。
9. ビヒクルがPCAリン酸カルシウムを少なくとも1g含む場合にビヒクルをラットの筋肉内部位に置いた時にPCAリン酸カルシウムの少なくとも約80%が1か月以内に再吸収されるようにPCAリン酸カルシウムが処方された、請求項1記載のビヒクル。

求項1記載のビヒクル。

10. P C Aリン酸カルシウムが完全に再吸収性であるように処方された、請求項1記載のビヒクル。

11. P C Aリン酸カルシウム材料がペーストである水和プリカーサーから形成された、請求項1記載のビヒクル。

12. 22℃において1時間より長い時間の後に硬化する傾向によって特徴付けられる水和プリカーサーからP C Aリン酸カルシウムが形成された、請求項1記載のビヒクル。

13. 37℃において1時間より短い時間の後に硬化する傾向によって特徴付けられる水和プリカーサーからP C Aリン酸カルシウムが形成された、請求項1記載のビヒクル。

14. 22℃において約10～30分の後に硬化する傾向によって特徴付けられる水和プリカーサーからP C Aリン酸カルシウムが形成された、請求項1記載のビヒクル。

15. ビヒクルの物理学的パラメーターを変化させるために選択される追加の

材料をさらに含み、前記物理学的パラメーターが強度、再吸収時間、付着性、注入可能性、摩擦特性、及び放出速度より成る群から選択される、請求項1記載のビヒクル。

16. 生物学的活性物質がタンパク質、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、核タンパク質、多糖類、糖タンパク質及びリボタンパク質より成る群から選択される、請求項1記載のビヒクル。

17. 生物学的活性物質が抗エイズ物質、抗ガン物質、抗生物質、ACE阻害薬、アドレナリン拮抗薬、制酸薬、免疫抑制薬、抗ウィルス物質、酵素阻害薬、神経毒、オピオイド、催眠薬、抗ヒスタミン薬、潤滑剤、トランキライザー、抗痙攣薬、筋弛緩薬、抗パーキンソン物質、鎮痙薬、筋収縮薬、下痢止め薬、制吐薬、緩下薬、利尿薬、縮瞳薬、抗コリン作用薬、抗緑内障化合物、抗寄生虫化合物、抗原生動物化合物、抗高血圧薬、鎮痛薬、解熱薬、抗炎症薬、抗ヒスタミン薬、咳止め剤、抗めまい薬、抗無気力薬、抗乗物酔い薬、局所麻酔薬、眼病薬、

プロスタグランジン、抗抑鬱薬、抗精神病性物質、制吐薬、イメージング剤、特定標的剤、栄養因子、成長因子、神経伝達物質、細胞応答調節剤（細胞機能修飾物質）、及びワクチンより成る群から選択される、請求項1記載のビヒクル。

18. 実質的に図5dに示したX線回折図形を有する結晶性不良のアパタイト系（PCA）合成リン酸カルシウム材料及び生物学的活性物質を含む、生物学的活性物質を送達するためのビヒクル。

19. 結晶性不良のアパタイト系（PCA）合成リン酸カルシウム材料及び生物学的活性物質を含み、前記リン酸カルシウム材料が、この材料1gをラットの筋肉内部位に置いた時にその量の少なくとも約80%が1年以内に再吸収されることを特徴とするものである、生物学的活性物質を送達するためのビヒクル。

20. 結晶性不良のアパタイト系（PCA）合成リン酸カルシウム材料及び生物学的活性物質を含み、前記リン酸カルシウム材料が、

ペースト又はパテの粘稠度を有する水和プリカーサーが形成されるように制限された量の水溶液の存在下で非晶質リン酸カルシウム（ACP）をプロモーターに暴露し、

水和プリカーサーを硬化させる

ことを含む方法から作られた、生物学的活性物質を送達するためのビヒクル。

21. プロモーターがカルシウム源を含み、このカルシウム源がACPのPCAリン酸カルシウムへの転化に関与するものであり且つPCAリン酸カルシウム中に組み込まれる、請求項20記載のビヒクル。

22. カルシウム源がCaO、CaC₂及び酢酸カルシウムより成る群から選択される、請求項21記載のビヒクル。

23. プロモーターがリン酸源を含み、このリン酸源がACPのPCAリン酸カルシウムへの転化に関与するものであり且つPCAリン酸カルシウム中に組み込まれる、請求項20記載のビヒクル。

24. リン酸源がH₃PO₄を含む、請求項23記載のビヒクル。

25. プロモーターがカルシウム源をさらに含み、カルシウム源及びリン酸源がACPとの反応において約1.1～1.9の範囲内のCa/P比を有するPC

Aリン酸カルシウムを生産するように選択され且つ組み合わされる、請求項23記載のビヒクル。

26. プロモーターが第二のリン酸カルシウムを含み、この第二のリン酸カルシウムがPCAリン酸カルシウムを生産するためのACPとの反応のための適切な化学量論を提供するように選択される、請求項20記載のビヒクル。

27. 第二のリン酸カルシウムがメタリン酸カルシウム、リン酸二カルシウム二水和物、デカリン酸七カルシウム、リン酸三カルシウム、ピロリン酸カルシウム二水和物、PCAリン酸カルシウム、ピロリン酸カルシウム、リン酸八カルシウム、リン酸四カルシウム及び非晶質リン酸カルシウムより成る群から選択される、請求項26記載のビヒクル。

28. プロモーターがDCPDである、請求項20記載のビヒクル。

29. プロモーターが化学量論のヒドロキシアパタイトである、請求項20記載のビヒクル。

30. プロモーターが約1~200 μm の平均粒径を有する粒状材料である、請求項20記載のビヒクル。

31. プロモーターが生物再吸収性である、請求項30記載のビヒクル。

32. プロモーターがPLLA及びPGAより成る群から選択される、請求項30記載のビヒクル。

33. プロモーターがACPのPCA磷酸カルシウムへの転化に関与しない、請求項20記載のビヒクル。

34. プロモーターが Al_2O_3 、マイカ、ガラス、及び砂より成る群から選択される材料である、請求項33記載のビヒクル。

35. プロモーターが水和プリカーサーを加熱することを含む処理である、請求項20記載のビヒクル。

36. 前記水溶液が生物学的活性物質との適合性のために選択された緩衝液である、請求項20記載のビヒクル。

37. ACP、プロモーター及び生物学的活性物質を生物学的活性物質との適

合性のために選択された緩衝液の存在下で互いに混合する工程、並びに

この混合物を硬化させる工程

を含む方法によって形成された、請求項20記載のビヒクル。

38. 反応性非晶質リン酸カルシウム及びプロモーターを水溶液の存在下で互いに混合して水和プリカーサーを形成させる工程、

水和プリカーサーを硬化させる工程、並びに

結晶性不良のアパタイト系リン酸カルシウムに生物学的活性物質を適用する工程

を含む方法によって形成された、請求項20記載のビヒクル。

39. 結晶性不良のアパタイト系合成リン酸カルシウム材料及び生物学的活性物質を含み、前記リン酸カルシウム材料が、結晶性不良のアパタイト系リン酸カルシウムが形成されるように結晶の形成が禁止された条件下で非晶質リン酸カルシウム（ACP）を反応させることを含む方法から作られた、生物学的活性物質を送達するためのビヒクル。

40. 結晶化禁止剤の存在下でACPを反応させた、請求項39記載のビヒクル。

41. 反応性非晶質リン酸カルシウムを用意する工程、並びに

この非晶質リン酸カルシウムと材料プロモーターとを結晶性不良のアパタイト系リン酸カルシウムを形成させるための割合で反応させる工程
を含み、

前記の反応を水性媒体中で生物学的活性物質の存在下で実施し、前記水性媒体を生物学的活性物質の活性が維持されるように選択し、結晶性不良のアパタイト

系リン酸カルシウム中又は上に生物学的活性物質が組み込まれるようにする、生物学的活性物質を送達するためのビヒクルの製造方法。

42. 反応性非晶質リン酸カルシウム（ACP）、生物学的活性物質、及び前記生物学的活性物質との適合性のために選択された水性緩衝液を任意の順序で混合する工程、

混合の前、後又は間に反応性ACPをプロモーターに暴露する工程、並びに

プロモーターに暴露した後にこの混合物を硬化させる工程

を含む、生物学的活性物質を送達するためのビヒクルの製造方法。

43. 反応性非晶質リン酸カルシウム（ACP）及び水溶液を任意の順序で混合する工程、

生物学的活性物質を添加する工程、並びに

混合及び添加工程の前、間又は後に反応性ACPをプロモーターに暴露する工程

を含み、前記プロモーターがACPの結晶性不良のアパタイト系（PCA）リン酸カルシウムへの転化を促進するようにする、生物学的活性物質を送達するためのビヒクルの製造方法。

44. 混合工程が、生物学的活性物質との適合性のために選択される水性緩衝液中で反応性ACPと材料プロモーターとを混合することを含む、請求項43記載の方法。

45. 生物学的活性物質を添加する工程の前又は後に行われる前記混合物を硬化させる工程をさらに含む、請求項43記載の方法。

46. PCAリン酸カルシウムを予め決定された形状に成形する工程をさらに含む、請求項43記載の方法。

47. PCAリン酸カルシウムを被検対象中に移植する工程をさらに含む、請求項43記載の方法。

48. 移植工程が、骨、筋肉、脊髄、中枢神経系、腹膜間腔、皮下、並びに眼のガラス体液及び房水より成る群から選択される部位における移植を含む、請求項47記載の方法。

49. 粉末の形の非晶質リン酸カルシウム（ACP）を用意する工程、

粉末の形の第二のリン酸カルシウムを用意する工程、

ACP又は第二のリン酸カルシウムを粉砕してより一層小さい粒子寸法を有する粉末を製造する工程、

ACP及び第二のリン酸カルシウムを、水和プリカーサーが形成されるように制限された量の水溶液と組み合わせる工程、並びに

P C A リン酸カルシウムの形成をもたらす条件下で水和プリカーサーを硬化させる工程

を含む、変更された生物再吸収性を有する結晶性不良のアパタイト系（P C A）リン酸カルシウムの再吸収速度を変更する方法。

50. 前記の組み合わせ工程が、

A C P と第二のリン酸カルシウムとを混合し、

この混合物を粉砕し、そして

粉砕された混合物に水溶液を添加する

ことを含む、請求項49記載の方法。

51. 非晶質リン酸カルシウム（A C P）を用意する工程、

インビボで再吸収される能力又はP C A リン酸カルシウムから浸出される能力のいずれかによって特徴付けられる材料を含む再吸収調節剤を用意する工程、

A C P を再吸収調節剤と組み合わせる工程、

再吸収調節剤と組み合わせる前又は後にA C P をプロモーターに暴露する工程

水和プリカーサーが形成されるように制限された量の水溶液をA C P /材料混合物に添加する工程、並びに

水和プリカーサーを再吸収調節剤が組み込まれたP C A 材料に転化させる工程を含む、

前記の再吸収調節剤が組み込まれたP C A 材料が、再吸収調節剤が組み込まれていない点以外は同一であるP C A 材料の再吸収プロフィールとは異なる再吸収プロフィールを有する、変更された再吸収性を有する結晶性不良のアパタイト系（P C A）リン酸カルシウムの製造方法。

52. 結晶性不良のアパタイト系（P C A）合成リン酸カルシウム及び少なくとも1種の細胞を含む、治療、構造又は美容移植片。

53. 前記の少なくとも1種の細胞が、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、間充織幹細胞、繊維芽細胞、筋細胞、肝細胞、実質組織細胞、腸管起源の細胞、神経細胞、及び皮膚細胞より成る群から選択される、請求項52記載の移植片。

54. 前記の少なくとも1種の細胞が少なくとも1種の組織形成性細胞を含む、請求項52記載の移植片。

55. 前記の少なくとも1種の細胞が少なくとも1種の骨形成性細胞を含む、請求項54記載の移植片。

56. 前記の少なくとも1種の細胞が少なくとも1種の軟骨形成性細胞を含む、請求項54記載の移植片。

57. 前記の少なくとも1種の細胞が少なくとも1種の組織分解性細胞を含む、請求項52記載の移植片。

58. 前記の少なくとも1種の細胞が一次組織外植片、一次組織外植片の製剤、孤立細胞の製剤、細胞株の製剤、変形細胞株の製剤及び宿主細胞の製剤より成る群から選択される製剤を含む、請求項55～57のいずれかに記載の移植片。

59. PCAリン酸カルシウムが高再吸収性である、請求項52記載の移植片。

60. PCAリン酸カルシウムが実質的に図5dに示したX線回折図形を有する、請求項59記載の移植片。

61. PCAリン酸カルシウムが 26° 、 28.5° 、 32° 及び 33° の 2θ 値において広いピークを含むX線回折図形を有する、請求項59記載のビヒクル。

62. PCAリン酸カルシウムが約1.5より小さいカルシウム対リン酸比を有する、請求項59記載のビヒクル。

63. ビヒクルがPCAリン酸カルシウムを少なくとも1g含む場合にビヒクルをラットの筋肉内部位に置いた時にPCAリン酸カルシウムの少なくとも約80%が1年以内に再吸収されるようにPCAリン酸カルシウムが処方された、請求項59記載のビヒクル。

64. ビヒクルがPCAリン酸カルシウムを少なくとも1g含む場合にビヒクルをラットの筋肉内部位に置いた時にPCAリン酸カルシウムの少なくとも約80%が9か月以内に再吸収されるようにPCAリン酸カルシウムが処方された、請求項59記載のビヒクル。

65. ビヒクルがPCAリン酸カルシウムを少なくとも1g含む場合にビヒクル

ルをラットの筋肉内部に置いた時にPCAリン酸カルシウムの少なくとも約80%が6か月以内に再吸収されるようにPCAリン酸カルシウムが処方された、請求項59記載のビヒクル。

66. ビヒクルがPCAリン酸カルシウムを少なくとも1g含む場合にビヒクル

ルをラットの筋肉内部に置いた時にPCAリン酸カルシウムの少なくとも約80%が3か月以内に再吸収されるようにPCAリン酸カルシウムが処方された、請求項59記載のビヒクル。

67. ビヒクルがPCAリン酸カルシウムを少なくとも1g含む場合にビヒクル

ルをラットの筋肉内部に置いた時にPCAリン酸カルシウムの少なくとも約80%が1か月以内に再吸収されるようにPCAリン酸カルシウムが処方された、請求項59記載のビヒクル。

68. PCAリン酸カルシウムが完全に再吸収性であるように処方された、請求項59記載のビヒクル。

69. 結晶性不良のアパタイト系リン酸カルシウム材料がペーストである水和プリカーサーから形成された、請求項59記載のビヒクル。

70. 22℃において1時間より長い時間の後に硬化する傾向によって特徴付けられる水和プリカーサーからPCAリン酸カルシウムが形成された、請求項69記載のビヒクル。

71. 37℃において1時間より短い時間の後に硬化する傾向によって特徴付けられる水和プリカーサーからPCAリン酸カルシウムが形成された、請求項69記載のビヒクル。

72. 22℃において約10～30分の後に硬化する傾向によって特徴付けら

れる水和プリカーサーから結晶性不良のアパタイト系リン酸カルシウムが形成された、請求項69記載のビヒクル。

73. インビボに置いた時に約15～40分以内に実質的に硬化することを特徴とする水和プリカーサーからPCAリン酸カルシウムが形成された、請求項6

9記載のビヒクル。

74. ビヒクルの物理学的パラメーターを変化させるために選択される追加の材料をさらに含み、前記物理学的パラメーターが強度、再吸収時間、付着性、注入可能性、摩擦特性、及び放出速度より成る群から選択される、請求項52記載のビヒクル。

75. 生物学的活性物質をさらに含む、請求項52記載のビヒクル。

76. 生物学的活性物質が細胞成長、細胞移動、細胞分化及び細胞限局化より成る群から選択されるプロセスに影響を及ぼすものである、請求項75記載のビヒクル。

77. 生物学的活性物質が成長因子及び細胞外マトリックス成分より成る群から選択される、請求項75記載のビヒクル。

78. 生物学的活性物質がラミネン、フィブロネクチン、コラーゲン及びそれらの組み合わせより成る群から選択される、請求項75記載のビヒクル。

79. 生物学的活性物質が栄養素、血管由来因子、及び免疫調節因子より成る群から選択される、請求項75記載のビヒクル。

80. 非晶質リン酸カルシウム(ACP)を用意する工程、

ACPをプロモーターに暴露する工程、

ACP及び制限された量の水溶液から水和プリカーサーを形成させる工程(ここで、水溶液の量は、水和プリカーサーがペーストの粘稠度及びパテの粘稠度より成る群から選択される粘稠度を有するように選択される)並びに

ACPをPCAリン酸カルシウムに転化させる工程

を含む方法によってPCAリン酸カルシウムが調製され、転化工程の前又は後に細胞が添加された、請求項52記載の移植片。

81. 暴露工程がACPを第二のリン酸カルシウムと組み合わせることを含み、前記の第二のリン酸カルシウムが転化反応に関与するものであり、得られるPCAが1.1~1.9の範囲内のCa/P比を有するように適切な化学量論を有するように第二のリン酸カルシウムが選択される、請求項80記載の移植片。

82. 第二のリン酸カルシウムがメタリン酸カルシウム、リン酸二カルシウム

二水和物、デカリン酸七カルシウム、リン酸三カルシウム、ピロリン酸カルシウム二水和物、PCAリン酸カルシウム、ピロリン酸カルシウム、リン酸八カルシウム、リン酸四カルシウム及び非晶質リン酸カルシウムより成る群から選択される、請求項81記載の移植片。

83. プロモーターがDCPDである、請求項81記載のビヒクル。

84. プロモーターが化学量論のヒドロキシアパタイトである、請求項81記載のビヒクル。

85. プロモーターがカルシウム源、リン酸源、及びそれらの組み合わせより成る群から選択され、このプロモーターが反応に関与するものであり且つ得られるPCAリン酸カルシウムが約1.1～1.9の範囲内のCa/P比を有するよう適切な化学量論のために選択される、請求項81記載の移植片。

86. 暴露工程がACPを転化反応に関与しないプロモーターと組み合わせる

ことを含む、請求項80記載の移植片。

87. プロモーターがAl₂O₃、マイカ、ガラス、砂、及び熱より成る群から選択される、請求項86記載の移植片。

88. プロモーターが約1～200μmの平均粒径を有する粒状材料である、請求項80記載の移植片。

89. プロモーターが生物再吸収性である、請求項80記載のビヒクル。

90. a. 硬化したPCAリン酸カルシウムに転化させることができる水和プリカーサーの形の組成物を用意し、

b. 組成物が硬化したPCAリン酸カルシウムになるように水和プリカーサーの転化を促進し、

c. 工程bの前又は後に組成物に少なくとも1種の細胞を導入する

ことを含む、治療、構造又は美容移植片の製造方法。

91. 組成物を用意する工程が、

a. 非晶質リン酸カルシウム(ACP)プリカーサー、

b. カルシウム源、リン酸源、カルシウム源とリン酸源との組み合わせ及びリン酸カルシウムより成る群から選択される第二のプリカーサー、並びに

c. 制限された量の水溶液

を含む水和プリカーサーを用意することを含む、請求項90記載の方法。

92. 水溶液が少なくとも1種の細胞との適合性のために選択された緩衝液である、請求項91記載の方法。

93. 前記細胞が軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、間充織幹細胞、繊維芽細胞、筋細胞、肝細胞、実質組織細胞、腸管起源の細胞、神経細胞、及び皮

膚細胞より成る群から選択される、請求項91記載の方法。

94. 前記の少なくとも1種の細胞が少なくとも1種の組織形成性細胞を含む、請求項53記載の移植片。

95. 前記の少なくとも1種の細胞が少なくとも1種の骨形成性細胞を含む、請求項83記載の移植片。

96. 前記の少なくとも1種の細胞が少なくとも1種の軟骨形成性細胞を含む、請求項53記載の移植片。

97. 前記の少なくとも1種の細胞が少なくとも1種の組織分解性細胞を含む、請求項53記載の移植片。

98. 少なくとも1種の細胞を導入する工程が、PCAリン酸カルシウムが少なくとも約20,000~1,000,000細胞/cm³となるような充分な数量の細胞を導入することを含む、請求項39記載の方法。

99. 硬化の前に水和プリカーサーを予め決定された形状に成形する工程をさらに含む、請求項39記載の方法。

100. 硬化したPCAリン酸カルシウムを予め決定された形状に成形する工程をさらに含む、請求項2記載の方法。

101. a. 多孔質PCAリン酸カルシウム、

b. 増殖培地、

c. PCAリン酸カルシウム中又は上にあり且つ増殖培地によって栄養を与えられるようにこの増殖培地と接触させた少なくとも1種の細胞を含む、インビトロ細胞培養系。

102. a. 次の i、ii及びiiiを含む水和プリカーサーを用意し、

i. 少なくとも1種の非晶質リン酸カルシウム（ACP）；

ii. 少なくとも1種の骨形成性細胞；

iii. 水和プリカーサーがペーストの粘稠度及びパテの粘稠度より成る群から選択される粘稠度を有するようにするのに充分な量の水溶液（この水溶液は、前記の少なくとも1種の骨形成性細胞と適合性であるものである）；

b. 前記水和プリカーサーを骨質部位に導入し、

c. 水和プリカーサーを硬化させる

ことを含む、インビボで骨を成長させる方法。

103. a. 次の i 及びiiを含む水和プリカーサーを用意し、

i. 少なくとも1種の非晶質リン酸カルシウム（ACP）；

ii. 水和プリカーサーがペーストの粘稠度及びパテの粘稠度より成る群から選択される粘稠度を有するようにするのに充分な量の水溶液；

b. 前記水和プリカーサーを骨質部位に導入し、

c. 前記導入工程の前又は後にACPのPCAリン酸カルシウムへの転化を促進し、

d. 骨形成性細胞を移植材料に入らせる

ことを含む、インビボで骨を成長させる方法。

104. a. 次の i、ii及びiiiを含む水和プリカーサーを用意し、

i. 少なくとも1種の非晶質リン酸カルシウム（ACP）；

ii. 少なくとも1種の軟骨形成性細胞；

iii. 水和プリカーサーがペーストの粘稠度及びパテの粘稠度より成る群から選択される粘稠度を有するようにするのに充分な量の水溶液（この水溶液は、前記の少なくとも1種の軟骨形成性細胞と適合性であるものである）；

b. 前記水和プリカーサーをインビボ部位に導入し、

c. 水和プリカーサーを硬化させる

ことを含む、インビボで軟骨を成長させる方法。

105. a. 次の i 及びiiを含む水和プリカーサーを用意し、

- i. 少なくとも1種の非晶質リン酸カルシウム（ACP）；
 - ii. 水和プリカーサーがペーストの粘稠度及びパテの粘稠度より成る群から選択される粘稠度を有するようにするのに充分な量の水溶液；
 - b. 前記水和プリカーサーをインビボ部位に導入し、
 - c. 前記導入工程の前又は後にACPのPCAリン酸カルシウムへの転化を促進し、
 - d. 軟骨形成性細胞を移植材料に入らせる
- ことを含む、インビボで軟骨を成長させる方法。

106. 水和プリカーサーにさらに生物学的活性物質を含ませ、この生物学的活性物質が軟骨形成性細胞を引きつけて移植後に軟骨形成性細胞が移植材料中に移動するようにするものである、請求項53記載の方法。

107. a. 次のi及びiiを含む、水和プリカーサーの形の組成物を用意する工程：

- i. 少なくとも1種の非晶質リン酸カルシウム（ACP）；
 - ii. 水和プリカーサーがペーストの粘稠度及びパテの粘稠度より成る群から選択される粘稠度を有するように選択される制限された量の水溶液；
 - b. ACPのPCAリン酸カルシウムへの転化を促進する工程；
 - c. 工程bの前又は後に宿主から単離された少なくとも1種の細胞を前記組成物中に導入する工程；
 - d. 前記の組成物中の少なくとも1種の細胞を、健康な宿主から単離された相似細胞が組織を形成する条件下で培養する工程；
 - e. 少なくとも1種の細胞が培地中で組織を形成する能力と健康な宿主から単離された相似培地細胞が培地中で組織を形成する能力との差を検出する工程；
- を含む、宿主の病気状態を検出する方法。

【発明の詳細な説明】

生体セラミック組成物

発明の背景

生物薬剤学の領域における多くの研究は、薬物送達やその他の外科的用途に有効な移植可能なビヒクルを開発する方向に指向される。そのようなビヒクルは、生物学的適合性でなければならずかつまたそれらを送達することを意図する任意の生物学的に活性な薬剤の活性を保護することができなければならない。多くの生物学的に活性な薬剤は、不安定であり、かつそれらを送達物質中に組み込む場合に、容易に活性を失う。タンパク質活性の保存は、特に困難な問題を持ち出してきた。

薬物送達アーリーナでは、リン酸カルシウムセラミックスが、それらの良く知られた生物学的適合性及びそれらのタンパク質試薬に対する親和力により、潜在的送達ビヒクルとして研究されてきた（例えば、I J n t e m a 等、I n t . J . P h a r m . 1 1 2 : 2 1 5 , 1 9 9 4 ; イトカズ等、J . O r t h . S u r g . 2 : 4 7 , 1 9 9 4 ; シント等、J . B o n e J o i n t S u r g . 7 4 - B : 6 0 0 , 1 9 9 2 ; ウチダ等、J . O r t h . R e s . 1 0 : 4 4 0 , 1 9 9 2 を参照）。しかし、既知のリン酸カルシウムセラミックス材料を製造するのに採用される反応は、高い温度及び／又は圧力を要し、かつまた酸又は塩基の存在を要するのが典型的である。ほとんどの生物学的に活性な薬剤は、セラミックを製造するのに要求される条件の一つ又はそれ以上によって破壊されるであろうことから、生物学的に活性な薬剤は、物質が製造された後に入れられることができるだけであり、これは、送達することができる薬剤の量及びタイプを制限し得る。

また、多数のリン酸カルシウム材料が、「再吸収性」と言われてきたが、そのような化合物は、通常リン酸三カルシウム、リン酸四カルシウム又はヒドロキシアパタイトを含み又はこれらに由来し、実際ほんのわずかに再吸収性である。群の中で、リン酸三カルシウム化合物は、最も再吸収性であることが立証されており、それらは、何年もの研究の後に、依然臨床設定において広く用いられていな

い。リン酸三カルシウムは、長くかつ幾分予測し得ない再吸収プロフィールを有することが知られており、再吸収のために1年以上を要するのが普通である。極めて多孔質又は溝を切ったリン酸三カルシウムを製造するための工程が取られない場合には、これらの化合物は骨によって代わられない。最近の研究は、「[ヒドロキシアパタイト] よりも大きいTCPの生分解が、十分なものでないという結論に至った (Berger等、Biomaterials, 16:1241, 1995) 』。

リン酸四カルシウム及びヒドロキシアパタイト由来の化合物もまたほんのわずかに再吸収性である。リン酸四カルシウム充填剤の公表された報告は、長い期間にわたる部分的再吸収性について一般的に記載している。例えば、Horiloglu等により報告されている通りに、そのような材料が80%再吸収のために30ヶ月を要することは異常なことではない (Soc. for Biomaterials, 198頁、1995年3月18~22日)。また、リン酸カルシウム材料の「再吸収」について記載している多くの報告は、著者等が、例えば移植部位からのビヒクルの移行を除かないことから、実際には再吸収を立証しない (例えば、上記のIntema等を参照)。

外科的アリーナでは、再建手術のゴールの内の一つは、損傷された組織を新しい組織、おそらく患者自身の細胞から生長された組織に代えることができることである。例えば、研究者等は、分離された軟骨細胞を損傷された領域中にポリマー骨格の関係で注入する軟骨再生系を開発しようと努めてきた (例えば、Atalla等、J. Urol. 150:747, 1993; Freed等、J. Cell. Biochem. 51:257, 1993及びそれらにおいて引用される文献を参照)。同様の播種された骨格系が骨修復の関係で研究されてきており、この場合造骨細胞がポリマー又はセラミック支持体と共に利用される (例えば、Elegendy等、Biomater. 14:263, 1993; Ishaug等、J. Biomed. Mater. Res. 28:1445, 1994を参照)。播種された組成物もまた膀胱調節及び膀胱尿管用途におけるそれらの使用効果について研究されてきた (例えば、Griffith-Cima等、公表されたPCT出願第WO94/25080号を参照)。

その分野における研究者等は、そのような播種された組成物において使用すべき骨格材料について望ましいいくつかの特性を識別してきた。例えば、Freed等(Bio/Technology 12:689, 1994)は、望ましい特徴として下記の6つの要因をリストしている：

- (1) 骨格表面は、細胞付着及び生長を可能にすべきである；
- (2) 骨格材料もその分解生成物も、インビボに移植した際に、炎症又は毒性を引き起こすべきでない；
- (3) 骨格材料は、三次元構造に再現可能に加工されるべきである；
- (4) 骨格材料は、細胞－骨格相互作用のための大きな表面積、細胞外マトリックス再生のための十分なスペース、及びインビトロ培養の間の最少の拡散制限を備えるように多孔度少なくとも90%を有すべきである；
- (5) 骨格材料は、一旦再生中の組織用のテンプレートとなることの目的になったら、再吸収されるべきである；及び
- (6) 骨格分解速度は、関心のある細胞タイプによる組織再生速度と調和するために調節可能であるべきである。

生物適合性であり、完全に再吸収可能でありかつ薬物活性に有害でない薬物送達ビヒクルを開発する要求が依然ある。また、組織修復において骨格として用いるのに適した材料を開発したい要求もある。本発明は、薬物送達及び組織修復において有用な物質及び組成物を提供して、これらの要求を解決する。

定義

「非晶質」—本明細書中で用いる通りの「非晶質」なる用語は、有意の非晶質特性を有する物質を意味する。有意の非晶質特性は、非晶質含量が75%よりも多い、好ましくは非晶質含量が90%よりも多いことを意図し、広い、特徴のないX線回折図形によって特性表示される。小さい結晶度が物質中に存在してよいことが認められる。しかし、本発明の非晶質プリカーサー物質について、結晶度は生成物物質において所望されるよりも小さいのが好ましい。

「生物活性な」—「生物活性な」とは、移植片中で及びそのまわりで硬い組織形成を誘発する物質を言う。軟質組織中に移植する場合、生物活性は、また、成

長又は栄養因子の存在すること、或は硬い組織形成性細胞タイプを移植片に播種することも必要とし得る。

「生物適合性」—本明細書中で用いる通りの「生物適合性」なる用語は、物質が、宿主において実質的に好ましくない応答を引き出さないことを意味する。外来の物体がリビング体中に導入される場合には、常に、物体が、宿主に対してネガティブ作用を与えることになる炎症応答のような免疫反応を誘発することになる懸念がある。例えば、ヒドロキシアパタイトは、一般に「生物適合性」であると考えられるが、結晶性ヒドロキシアパタイトマイクロキャリアが動物の筋肉内に挿入される場合には、有意の炎症及び組織壊死が観察された（例えば、J. Int. J. Pharm. 112:215 (1994) を参照）。

「生物再吸収性」—「生物再吸収性」とは、物質がインビボで再吸収されることのできることを言う。「完全な」再吸収とは、有意の細胞外断片が残らないことを意味する。再吸収プロセスは、元の移植片物質を体液、酵素又は細胞の作用によって除去することを伴う。再吸収されるリン酸カルシウムは、例えば、骨ミネラルとして、又は体内でその他の方法で利用されることによって再付着され、又は排出されることができる。本明細書中で用いる通りの「強度に生物再吸収性」なる用語は、筋肉内に又は皮下に植片された物質の全質量の少なくとも80%、好ましくは95~99%、最も好ましくは>99%が1年以内に再吸収されることを意味する。発明の好適な実施態様では、吸収性の強い結晶性不良のアパタイト系 (apatitic) (PCA) リン酸カルシウムは、少なくとも1g（好ましくは1~5g）のPCA物質を皮下又は筋肉内部位に移植する場合に、物質の少なくとも80%が1年以内に再吸収されることを特徴とする。一層好適な実施態様では、その物質は、9ヶ月、6ヶ月、3ヶ月、理想的には1ヶ月以内に再吸収されることになる。その上に、特に好適な物質は、規定の期間で完全に吸収されることができることを特徴とする。この開示の目的で、吸収性の「弱い」とは、出発物質の80%未満が1年経過後に再吸収されることを意味する。

「有効量」—生物学的に活性な薬剤の有効量は、所望する生物学的応答を引き出す程の量である。

「硬化」－「硬化」とは、水和されたプリカーサーが変形されて硬化されたP C A物質になるプロセスを言う。P C A物質は、それが実質的に非成形適性固体になる場合に、「硬化された」と考える。そのような硬化されたP C A物質は、最少の圧縮性を有しかつ弾性変形と対照してプラスチックを受ける傾向にある。

「水和されたプリカーサー」－本明細書中で用いる通りの「水和されたプリカーサー」なる用語は、乾燥したP C Aプリカーサーを限られた量の水溶液（すなわち、およそ1 mLよりも少ない水溶液／プリカーサー粉末1 g）の存在において水和することによって形成されるペースト又はパテを言う。水和されたプリカーサーは、転化が進行した程度に応じて、反応体及び生成物の両方を種々の組合せで含んでよい。本明細書中に記載する「注入適性な」及び「成形適性な」プリカーサーペーストは、共に水和されたプリカーサーである。好適な「注入適性な」水和されたプリカーサーは、18ゲージ針を通して送達するために適したコンシステンシーを有する。

本明細書中で用いる通りの「結晶性不良のアパタイト系リン酸カルシウム」、「P C Aリン酸カルシウム」及び「P C A物質」なる用語は、合成の結晶性不良のアパタイト系リン酸カルシウムを表示する。P C A物質は、それが固有のX R D及びF T I R図を有しさえすれば、必ずしも単一のリン酸カルシウム相に限定されない。P C Aリン酸カルシウムは、実質的に骨と同じX線回折スペクトルを有する。そのスペクトルは、 $20 \sim 35^\circ$ の領域における2つだけの広いピークで、一つは 26° を中心にしかつ他は 32° を中心にすることを特徴とする。それは、更に 563 cm^{-1} 、 1034 cm^{-1} 、 1638 cm^{-1} 及び 3432 cm^{-1} （ $\pm 2\text{ cm}^{-1}$ ）におけるF T I Rピークを特徴とする。鋭いショルダーが、 603 cm^{-1} 及び 875 cm^{-1} において、 1422 cm^{-1} 及び 1457 cm^{-1} に最大を有する二重項と共に観測される。

「プロモーター」－本明細書中で用いる通りの「プロモーター」なる用語は、水和されたプリカーサーの硬化を促進しかつA C PのP C Aリン酸カルシウムへの転化を増進させ得る物質又は処理を表示する。いくつかのプロモーターは、転化に加わって生成物P C A物質中に組み込まれ；「不動の」プロモーターとして知られる他のプロモーターは、加わらない。

「反応性」－「反応性」とは、本明細書中、非晶質のリン酸カルシウムに水和されたプリカーサーを形成するために液を混合する際に、プロモーターの存在においてプリカーサー物質の硬化に関連して本発明のPCA物質への転化を受ける能力を言う。好適なACPは、完全に転化する能力、硬化により急速に転化する能力、その他は不活性な化合物により転化を受ける能力及び／又は実質的に均質なPCA物質に転化する能力を特徴とする。ACPに第二のリン酸カルシウムを反応させる場合に、「転化」は、ACP及び第二リン酸カルシウムの両方の転化を包含することができる。硬化度及び硬化プロセスの速度論もまた反応性の重要な要素である。いくつかのACPは、他に比べて一層反応性である。ACPは、それが、 $100\mu\text{m}$ よりも大きい粒度の有意のフラクシオンを含有する粒子分布を有するリン酸二カルシウム二水和物（「DCPD」）のような弱いプロモーターの存在においてPCA物質への転化及び硬化を受けるならば、「高度に反応性」と考える。好適な高度に反応性のACPは、弱く促進するDCPD及び 37°C の水の存在において硬化されたPCA物質を12時間よりも短い時間で生成し、硬化は、約1～5時間、理想的には10～30分で実質的に完全である。

発明の要約

本発明は、優れた生物適合性、再吸収性、及び加工性特性を有しかつ薬物送達及び細胞播種（インビボ及びインビトロ）用途において有用な合成の結晶性不良のアパタイト系リン酸カルシウム物質を提供する。

本発明において用いる合成のPCA物質は、細胞及び多数の生物学的に活性な薬剤と適合し得る。その物質は、薬剤又は細胞を体中の種々の部位のいずれかに送達するのに用いることができ、又はインビトロで使用することができる。その物質は、その結晶性不良を示す示差的X線回折図形によって特性表示される。その物質は、カルシウム対ホスフェート比約1.1～1.9の範囲を有するのが好ましい。この比は、約1.3～1.5の範囲であるのが一層好ましい。

本発明において用いるPCA物質は、強度に生物適合性である。すなわち、物質少なくとも1gを含む移植片をペレット形態で筋肉内又は皮下部位に移植する場合に、物質の少なくともおよそ80%、好ましくは90～95%、最も好まし

くは>95%が1年以内に、好ましくは9ヶ月、6ヶ月、3ヶ月、理想的には1ヶ月以内に再吸収される。一層好ましくは、移植片5gの少なくとも80%、好ましくは90~95%、最も好ましくは>95%がこれらの時間枠内に再吸収される。物質の配座（例えば、棒又はその他の形状に比べて球の）が、その再吸収速度に影響を与え得ることは認められるものと思う。その上に、送達ビヒクルの再吸収速度は、その製造様式によって変えることができる。

本発明の好適な実施態様では、合成のPCA物質は、少なくとも一種の非晶質リン酸カルシウム（ACP）プリカーサーをプロモーターに暴露する反応において形成される。特に好適な実施態様では、プロモーターは、第二のリン酸カルシウム物質を含む。本発明において用いるPCA物質を製造するのに採用する反応条件は、穏和であり、それで所望ならば、生物学的薬剤又は細胞を形成反応の間に物質中に組み込むことができる。別法として、薬剤は、送達ビヒクルを造った後に、組み込んでよい。送達ビヒクル物質は、生物学的に活性な薬剤又は細胞を導入する前か又は後のいずれかに、種々の有用な送達形状のいずれかに形成してよく、かつ例えば注入又は外科的移植によって部位に送達してよい。その物質は、湿潤の非硬化状態（すなわち、水和されたプリカーサーとして）で部位に導入して現場で硬化させてもよい。ビヒクルは、代わりに、高い温度、通常37℃で又はそれよりも高い温度でインビトロで硬化させ、その後被検者（動物又はヒト）の中に外科的移植してもよい。

本発明のPCA物質は、インビトロで生物学的に活性な薬剤又は細胞の存在又は不存在のいずれかにおいて加工してもよい。別法として、生物学的に活性な薬剤又は細胞は、予備成形したビヒクルを薬剤に暴露することによって硬化後に加えてもよい。

従って、本発明は、PCAリン酸カルシウム及び生物学的に活性な薬剤を含む、生物学的に活性な薬剤を送達するためのビヒクルを提供する。発明は、随意に、他の生物再吸収性物質、侵食速度調節剤、細胞、又はビヒクルの一つ又はそれ以上の特性（強度、粘着性、注入適性、摩擦特性、等のような）を改質するその他の因子を含む。本発明の送達系の利点の一つは、薬物の高い局部濃度を達成することを可能にすることであり、これは、毒性の副作用を有する薬物かつまた不

安定な薬物に関して特に有用である。

発明は、また、送達ビヒクルを調製する方法、送達ビヒクル特性を変更する方法、及び生物学的に活性な薬剤を部位に送達する方法を提供する。好適な送達部位は、インビボ部位及びインビトロ部位の両方を含む。発明の送達ビヒクルは、ヒト又は動物の部位中に送達するために適している。好適なインビボ部位は、骨性部位、筋肉内部位、腹膜間部位、皮下部位、中枢神経系部位、及び視覚部位を含む。

本発明は、加えて、PCA物質及び少なくとも一種の細胞を含む、治療上、構造上、又は化粧上の移植片を提供する。少なくとも一種の細胞は、骨形成性又は骨分解性細胞であるのが好ましい。特に有用な細胞タイプは、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、間葉幹細胞、線維芽細胞、筋細胞、肝細胞、実質細胞、腸原の細胞、神経細胞、及び皮膚細胞を含み、一次組織外植、一次組織外植の調剤、分離細胞、細胞株、変換細胞株、及び宿主細胞として供することができる。移植片は、また、特性（生物再吸収性、強度、粘着性、注入適性、摩擦特性、等のような）を変更する生物学的に活性な薬剤又は因子のような更なる成分を含んでもよい。

発明は、また、そのような移植片を調製する方法；骨又は軟骨をインビボ又はインビトロで、天然の部位又は異所性部位において成長させる方法；骨性増強の方法；及び宿主から分離した細胞の組織形成性ポテンシャルをアセイすることによって疾患状態を診断する方法を提供する。発明は、また、インビトロ細胞培養系及び細胞被包マトリックスも提供する。

図面の説明

図1は、相対的に不明瞭な境界を有しかつ一部無形の形態（矢印）に浸漬されたクラスター中のナノメートルサイズの粒子を例示する反応性の非晶質リン酸カルシウムの高分解能透過電子顕微鏡写真である；

図2は、真空加熱手順後にCa/Pが1.58であることを生じた本発明の反応性の非晶質リン酸カルシウムのエネルギー分散型電子マイクロプローブスペクトルである；

図3は、本発明の非晶質リン酸カルシウムに由来する結晶性不良のアパタイト系リン酸カルシウム生成物の、結晶性ヒドロキシアパタイトに比較した際の溶解度カーブである。37℃の溶液中に放出されるカルシウムイオンの量によって測定する通りの、本発明の物質の、一層結晶性のヒドロキシアパタイトの形態に対して溶解度が相対的に一層大きいことに留意すること；

図4は、発明の骨代用物質を形成する反応において使用するの反応性の非晶質リン酸カルシウム；及び（b）二リン酸二カルシウムのX線回折図形である；

図5a～dは、本発明のPCA物質を形成するための反応性の非晶質リン酸カルシウムと二リン酸二カルシウムとの混合物の反応の進行をたどるX線回折図形である；

図6は、（a）リン酸二カルシウム二水和物、（b）発明の活性されたACP、及び（c）本発明のPCA物質の赤外スペクトルである； 図7は、天然産の骨のX線回折図形である。

図8は、例5に記載する種々の配合物の粒径分布を示す棒グラフである。

図9は、本発明のPCA物質を種々の骨性部位において使用することを表す。

図10は、本発明のPCA物質によって処理しない（10a）又は処理した（10b）のいずれかの頸骨欠陥の顕微鏡写真を提示する。図10aにおいて、小さい矢印は、欠陥の一縁を示し；大きい矢じりは、まだ架橋されない欠陥にある。図10bにおいて、大きい矢じりは、欠陥の一縁を示す。両方の図において、倍率は4×であり、骨は脱灰され、かつスライドはヘマトキシリン及びエオシンで処理される。

図11は、本発明の薬剤送達ビヒクルで外科処理して8週後の欠陥中に成長した犬の小柱骨の顕微鏡写真である（倍率10×；脱灰された；ヘマトキシリン及びエオシン）。

図12は、本発明の薬剤送達ビヒクルで処理した手術後4週の犬の皮質骨の顕微鏡写真である（倍率4×；未脱灰の；Light Green Basic Fuchsin）。

図13は、手術後4週の未処理の（図13a）及び処理した（図13b）ウサ

ギの頸骨欠陥の顕微鏡写真を提示する（倍率4×；脱灰された；マッソンの三色法）。

図14は、軟骨形成が生じた骨部位の外にある領域の顕微鏡写真である（ヘマトキシリン及びエオシン）。

図15は、例1～2に記載する通りにして調製したPCAリン酸カルシウムX線回折図形である；

図16は、例1～4に記載する通りにして調製したPCAリン酸カルシウムのX線回折図形である；

図17は、 Al_2O_3 ピークが線によって示される、 Al_2O_3 不動プロモーターから調製したPCAリン酸カルシウムのX線回折図形である；

図18は、ウサギから回収した物質のXRT分析を示す。

図19は、ウサギから回収した物質のFTIR分析を示す。

図20は、新しい骨形成及びPCA物質再吸収についての結果を示す。

好適な実施態様の記述

PCA物質

本発明のPCA物質は、同時継続中の出願U. S. S. N. 08/650, 764及び／又はU. S. S. N. 08/446, 182に記載されており、これらの各々を本明細書中に援用する。その物質は、また、「Delivery Vehicle」；「Conversion of Amorphous Calcium Phosphate to Form a Novel Bioceramic」；「Orthopedic and Dental Ceramic Implants」；及び「Bioactive Ceramic Composites」なる表題の一連の関連する出願中にも記載されており、これらの各々は、本願と同じ日付であり、かつ本明細書中に援用する。これらの関連する出願の各々における開示の幅に照らしてみれば、発明のPCA物質の詳細は、ここに詳説しないことにする。その特徴の要約が十分になる。

本発明において採用するPCA物質は、その生物適合性、その生物学的再吸収性及びその最少の結晶性を特徴とする。その物質は、高度に多孔質でありかつ急

速に再吸収可能でも又は多孔度の低いかつ吸収性の遅いものでもよい。その結晶特性は、実質的に天然の骨と同じであり、当分野に知られている骨代用物質において見られる一層高い結晶度が欠けている。発明のPCA物質は、また、生物適合性でありかつ宿主に有害でない。

本発明のPCA物質は、患者にペースト又はパテ形態で（すなわち、水和されたプリカーサーとして）移植することができる。硬化されたPCA物質を生成する発明の反応は、体外で開始させることができ、かつ室温でゆっくり進行するので、その物質が、外科部位に適用する前に「硬化し」て使えなくなることになるという可能性を最少にする。反応は、体温で有意に速くなり、その物質は適所で硬化する。この特徴は、デバイスを移植位置に慣習的に取り付けることが典型的に要求される外科的設定において特に有用である。例えば、発明のいくつかの好適な実施態様では、抗生物質及び／又は再生因子を骨折部位に送達する。そのような実施態様では、治療薬剤を含有する発明のペーストを、骨折部位に適用する及び骨折部位を充填するのに、並びに所望の薬剤を送達するのに使用することになる。

別法として、発明のPCA物質は、体外で予備硬化させ、所望の生物学的薬剤又は細胞を入れ、そしてもっと後の時間に移植してもよい。このアプローチは、慣習的の形状が必須でなく、かつ移植片を多数製造することが所望されるそれらの状況において有用である。

本発明の形成反応は、外科部位に適用した後に、完了させるのが普通である。その物質は、生理的条件下で、5時間よりも短い時間で硬化するのが典型的であり、約1～5時間で硬化するのが実質的である。その物質は、約10～30分内で実質的に硬化されるのが好ましい。PCA物質のコンシステンシー及び成形適性、並びに形成反応の速度は、治療要求に従いいくつかの簡単なパラメーターを変えることによって変更してもよい。

本発明において採用するPCA物質の再吸収性は、その多孔度、その化学的組成、及びその結晶度に起因し得る。アパタイトは、低い結晶特性を有し、一層結晶性の種に比べた場合に、水性系への幾分増大した溶解度を示す。発明のPCA物質の低い結晶度、及び／又はその中に安定な非晶質領域が存在することは、そ

れの生物学的系における再吸収性を促進すると考えられる。

本発明のPCA物質の再吸収性は、その密度及び／又は多孔度を変更することによって改質することができる。多孔度は、その物質の内部への及び内部からの物質の拡散を共に、かつ所定の用途では、細胞及び細胞プロセスの物質マトリックス中への浸透を容易にする。薬物送達物質は、多孔度が小さい程、多孔度が大きいものに比べて、インビボで再吸収されるのに一層時間がかかる傾向にある。発明の一実施態様では、多孔度は、調節された粒度の反応体の乾燥混合物を使用することによって増大させ；他の実施態様では、化学的又は物理的エッチング及び浸出技術を採用する。

これより、本発明の異なる実施態様は、異なる再吸収レートを有するPCA物質をもたらす。反応体、多孔度、最終の結晶度、並びに使用する結晶化抑制剤の量及びタイプは、本発明のPCA物質の異なる実施態様を生じ、それで、異なる実施態様では、物質1gは、2週～1、3、6、又は9ヶ月、1年までの任意の所望の期間内で再吸収される（すなわち、少なくとも80%、好ましくは90～95%、最も好ましくは>95%、再吸収される）。

本発明の好適な実施態様では、PCA物質を生成する反応は、生理的塩類溶液を2つの乾燥成分の混合物に加えることによって開始させ、それで約半時間で硬化する濃いペーストを形成するようにする。血清、組織培地、又は別の緩衝溶液又は蒸留水のようなその他の水性薬剤を、血清に代えて使用してよい。生成した再吸収性PCA物質が「カルシウム欠乏」になるのは、最もしばしばであり、ホスフェートに対するカルシウムの比は、ヒドロキシアパタイトについての理想的な化学量論値およそ1.67に比べて、1.5よりも小さい。

発明は、適したPCA物質及び反応性プリカーサーを識別するためのテストを提供する。詳細には、プリカーサーと一緒にし、限られた量の水で水和し（ペースト又はパテを形成するように）、硬化させてPCA物質にする。望ましいプリカーサーは、湿り環境において、体温で又は体温近くで硬化することができる。硬化された生成物を、次いでテスト動物の筋肉内又は皮下に入れる。望ましい物質は、少なくとも1gのペレットとして移植する場合に、少なくとも80%、好ましくは90～95%、最も好ましくは>95%が1年（又はそれ以下）以内に

に再吸収される物質である。好ましくは、その物質は、完全に再吸収されることができる。グラム量の物質を皮下部位に再吸収されるのをテストするのが一層容易であるのが普通である。

本発明のPCA物質は、少なくとも一種の非晶質リン酸カルシウム(ACP)プリカーサー、好ましくは活性化されたACP(例えば、例1〜4を参照)を用いる反応において形成する。反応は、一種だけのプリカーサーACPを用い、これを管理された方式で一部又は完全に発明のPCA物質に転化させてもよい例が、いくつかある。別法として、反応は、一種又はそれ以上の更なるプリカーサー(好ましくは、一種又はそれ以上のカルシウム及び／又はホスフェート源)を含むプロモーターを用い、ACPと一緒にして発明のPCA物質を生じてよい。また、非関与性プロモーターを用いて、活性化されたACPを発明のPCA物質に転化させるのを助成してもよい。何にしても、体外で開始させることができ、ペースト様形状で実施することができ、かつ37℃において有意に速度が増して硬化されたリン酸カルシウム生成物になる反応は、非常に好適である。

ACPのPCA物質への転化は、水の存在において促進される。ACPは、粉末として供し、他の反応体(例えば、第二のリン酸カルシウム)を組み合わせ、ペースト又はパテを形成するように、限られた量の水に暴露する。水和されたプリカーサーは、次いで硬化し、硬化は、PCA物質の形成と関連付けられる。本発明の目的は、ACPのPCA物質への転化を管理された方式で促進し、予想通りに硬化しかつ歯科、整形外科、薬物送達、細胞治療、及び／又はその他の用途において実用性を有する水和されたプリカーサーペースト又はパテを製造する方法を提供するにある。この転化を行うのに用いるプロモーターは、それら自体PCA物質に転化されてもよく、或は他の化学的又は物理的反応に加わってもよい。いくつかの好適なプロモーターは、また、転化の間変化しないで、触媒又は成核剤機能を与えてもよい。これに関して特に適しているのは、PCAリン酸カルシウムを製造するための結晶化を弱く助成する反応性表面を備えた物質である。

ACPプリカーサーだけ：非晶質リン酸カルシウムを再吸収可能なPCA物質を製造するための単一のプリカーサーとして使用する場合に、ACPが高結晶性ヒドロキシアパタイトに転化する自然の傾向を調節することが重要である。他方

で、転化の時間経過は、外科的使用効果を有する程に速くすべきである。一つのアプローチは、結晶形成の抑制剤を含有するプリカーサーACP（例えば、例1の）ACPを、結晶形成の抑制剤を含有しないACP（例えば、プリカーサー）と組み合わせることである。反応体を、乾燥状態で、適当な粒子サイズ及び過剰の抑制剤含有ACPと混合してもよい。反応体を、次いで、水を添加するような結晶形成条件に暴露した後に、温度の上昇（例えば、体中に導入した後に起きる通りの）に暴露して反応体を発明のPCA物質に転化させることができる。転化を調節する他の方法は、触媒の使用を伴う。

ACPプリカーサー+更なるリン酸カルシウム源：ACPを、第二のカルシウム源（第二のACPを含む）と、任意の反応促進技術を用いて反応させることができる。好適な実施態様では、第二のカルシウム源は、それ自体プロモーターである。促進させる反応は、非晶質リン酸カルシウムの硬化されたナノ結晶性又は結晶性不良のアパタイト系リン酸カルシウムへの転化である。そのような反応は、酸/塩基、変異、置換、及び加水分解反応並びに純粋に物理的又は機械的反應（例えば、粉碎、混合）を含む。また、ACPのPCA物質への表面触媒される転化のような触媒転化を採用してもよい。任意の反応スキーム下で、ACPは、反応中ずっと有意の非晶質性を保留することが重要である。詳細には、出発ACP内の総括結晶度は、最終生成物において所望する結晶度を越えるべきでない。これより、所定の反応スキームは、反応期間中ずっとACPの非晶質性の安定化を要し得る。当分野に知られかつそのような安定化について有用な結晶形成の抑制剤の例は、カーボネート、ピロホスフェート及びマグネシウムを含む。

いくつかの好適な実施態様では、第二カルシウム含有反応体又はその他のプロモーターによって促進する転化を助成するために、ACP成分を熱下で活性化する。適したそのような第二反応体プロモーターの例は、DCPD、その他の結晶性又は結晶性不良のリン酸カルシウム、カルシウム源、ホスフェート源、又は第二のACPを含む。置換基の間の反応を促進するのに、触媒作用或はイオン性溶媒又は核形成のプロモーターの使用のような、転化を促進するその他の方法を採用してもよい。第二のリン酸カルシウム反応体は、任意の結晶構造のものでよく、第一ACPと直接か或はイオン性溶媒又は触媒のような反応増進用ビヒクルを

使用することによるのいずれかで反応性になるように選ぶべきである。適した反応条件は、反応体を混合しかつ水を加えた後に、37℃において急速に硬化することの証拠によって決めることになる。

送達ビヒクル形成反応は、また、多孔質である最終生成物を製造するようにデザインしてもよい。一実施態様では、管理した粒子サイズの反応体の乾燥混合物を使用すると、多孔質物質になる。化学的又は物理的エッチング及び浸出のような、多孔度を助成するその他の方法を採用してもよい。

本発明は、標準の非晶質性のリン酸カルシウム沈殿を活性化して高度に反応性の非晶質固体にする新規なプロセスを提供する。非晶質固体を上記した反応において用いて、生物活性、生物適合性及び構造上の結合性を備えた結晶性不良の又はナノ結晶性の合成アパタイト系リン酸カルシウムを形成することができる。新規な非晶質物質は、他のリン酸カルシウムと37℃又はそれ以下で反応させて結晶性不良のアパタイト系リン酸カルシウムからなる骨様物質を形成することができる。

慣用の結晶性リン酸カルシウムの従来技術の酸-塩基反応は、反応不良の固体を生成し、あまりに結晶性でリビング組織に十分に再吸収され得ない反応生成物を有する。従来技術からの反応は、一般に不完全であり、かつ反応生成物は、不均質である。対照して、本発明の非晶質リン酸カルシウムは、広い範囲のリン酸カルシウム及びその他のカルシウム又はリン保持物質と急速にかつ完全に反応して均質な生成物をもたらす。

本発明のACPの高い反応性の源は、完全には理解されない；しかし、それは、本発明のプロセスによって造られる通りの、物質における非晶質性（結晶性の不足）、いくつかの実施態様では、イオン対部位空格子と関連づけられると考えられる。空格子は、続く反応用の反応性部位となり得る。これらの観察を、下記に一層完全に検討することにする。

本発明の方法は、1000オングストロームよりも小さい、好ましくは200～500オングストローム、最も好ましくは300オングストロームの非晶質リン酸カルシウム粒子の初期形成を可能にし、粒子のそれ以上の成長は、生成物を溶液から急速に沈殿させることによって短縮する。カルシウム及びホスフェート

イオン源を反応させて非晶質リン酸カルシウムを形成する間、第三イオンを溶液中に導入し、それでこの第三イオンを、三価の PO_4^{3-} 基の代わりに非晶質沈殿構造に組み込むようにする。いくらかの PO_4^{3-} が第三イオンに代わられることから、総括の PO_4^{3-} は減少し、こうして非晶質沈殿の Ca/P 比を増大し（標準の非晶質リン酸カルシウムに比べて）かつリン酸カルシウムの原子価又は電荷状態を改質する。次いで、非晶質固体を急速に凍結乾燥させて物質の化学的及び物理的性質を保存してもよい。次いで、非晶質固体を第三イオンの少なくともいくらかを除くのを促進するために選ぶ特定の条件下で処理してよい。第三イオンがカーボネートである場合に、特定の温度及び圧力条件は、生成物非晶質性を保ちながら、非晶質固体から全炭素を、おそらくはガス状二酸化炭素として減少させるに至る。

生成する物質は、非晶質リン酸カルシウムにおいて典型的に認められる（過去において一般に報告される比は、1.50である）のに比べて高い Ca/P 比を有する非晶質固体である。更に、その物質から炭素を除くと、非晶質固体内の隙間構造に空格子を生じる。いくつもの可能な空格子源が存在し得る。その物質は、表面積の増大のような、種々の手段によって反応性を促進する多孔度を保有する。その物質は、また、第三イオンを除く際に、化学量論バランスの変化を受け得る。この化学量論変化は、電荷の不均衡を生じ得、これは、非晶質リン酸カルシウムの反応性の増大の原因になる。

プロセス全体を通して物質内に実質的な非晶質特性を維持することが望ましい。全体として（単一の結晶性領域）、又は局部領域（微結晶性領域）においてさえ結晶度をプロセスの間又は最終生成物において過度に導入するならば、固定は、反応性が低くなることが分かった。生成した高度に反応性のリン酸カルシウムは、性質が非晶質でありかつカルシウム対三価リン比1.55～1.65の範囲を有する。好適な実施態様では、非晶質リン酸カルシウムは、 Ca/P 比約1.58を有する。

非晶質リン酸カルシウムの非晶質状態は、沈殿プロセスの速度及び期間を調節することによって誘発させる。本発明の非晶質リン酸カルシウムは、溶液から初期の沈殿が急速な条件下で沈殿させる。急速な沈殿は、多数の極端に小さいリン

酸カルシウム核の形成を生じる。加えて、急速な結晶又は粒子成長は、各々の粒子内で一層多くの欠陥を生じるに至り、それによりまた溶解度を増大させる。範囲の一番端において、結晶又は粒子成長は、非常に急速でありかつ欠陥密度は、非常に有意であるので、非晶質リン酸カルシウムが生じる。非晶質リン酸カルシウムは、ゲル様でありかつ可変の組成を有する固溶体を含む。これらのゲルは、長距離構造を持たないが、オングストロームスケールで測定する場合に、均質である。これらの非晶質化合物は、生理的条件下で、高い溶解度、高い形成速度及び結晶性不良のアパタイト系リン酸カルシウムへの高い転化速度を有する。

この方法によって獲得される非晶質リン酸カルシウム固体は、最終反応中に実質的に非晶質の固体として導入する程に十分に長くそれらの非晶質性を保留する。また、それらにホスフェートを含有するその他の固体又は溶液を混合及び反応させて、均質な分布のナノメートルサイズの結晶を含有する固体を得ることもできる。更に、好適な実施態様では、非晶質リン酸カルシウムは、他の固体と完全に反応することから、生成する固体のCa/Pは、そのような溶液から全カルシウム及び三価リンを構成することになる、すなわち本質的に完全な反応が存在することになる。溶液又は固体からの適当なモル濃度のホスフェートを新規な非晶質リン酸カルシウム物質と反応させる場合に、結晶性不良のアパタイト系リン酸カルシウム物質（Ca/P 1.1～1.9）が得られる。これより、本発明は、生成する生成物の化学的組成をデザイン及び改質することを可能にし、それにより送達ビヒクル又は細胞骨格として用いる最終生成物の生物活性を調節するそれ以上のモードを提供する。

本発明の一実施態様では、カルシウム及びホスフェートイオン並びに第三イオンを、リン酸カルシウムの急速な核形成及び沈殿を促進することになる濃度、pH、及び温度で含有する溶液を調製する。沈殿が十分に速い場合に、非晶質のゲル様リン酸カルシウムが形成される。ヒドロキシアパタイトの熱力学的に有利な結晶性形態は、反応の速度を低下することによって増進されることから、確実に非晶質化合物を得るには、反応の速度を増大させる所定の加工工程を採るのがよい。本発明の非晶質リン酸カルシウムを急速に沈殿させるための溶液をデザインする場合に、取り分け下記の要因を考慮すべきである。

好適な条件：反応の速度を増大させるためのカルシウム及びホスフェート源の急速な混合物。生成物として不安定な相を有利にするために反応速度を増大させる。イオンの各々が正しく並んで固体を形成するために反応時間を長くさせる程、一層熱力学的に有利な結晶性及び安定性の構造を生じることになる。

好適なカルシウム及びホスフェート源：極めて濃厚な又は近過飽和の溶液を使用すると、一層急速な反応が起きるのを確実にする。

好適な温度：反応を室温で実施することができるが、一反応体の濃度を増大させるための近沸点の温度は、反応の速度を増大させる可能な手段である。

一実施態様では、カルシウムイオン、ホスフェートイオン及びカーボネートイオンを水溶液中で一緒に急速に混合してカーボネート含有非晶質リン酸カルシウム固体を得る。イオンの相対濃度を選定して所望のCa/P比を有する沈殿とする。カーボネートイオンは、非晶質リン酸カルシウムにおいてホスフェートイオンに代わる。カーボネート水溶液から沈殿させることによって、炭酸塩化された非晶質リン酸カルシウムを得てもよい。適したカーボネート水溶液は、単に例として、バイカーボネート溶液、炭酸カルシウム、炭酸カリウム溶液を含む。更に、非水性溶液を使用することは、発明の範囲内と考える。

炭酸塩化された物質を使用することは、 PO_4^{3-} を CO_3^{2-} に代えることによってCa/P比の操作を可能にすることから、望ましい。加えて、 CO_3^{2-} の存在は、非晶質リン酸カルシウムにおいて結晶度の発現を遅らせることが知られている。しかし、Ca/P比を改質する際に及び反応性部位空格子を非晶質リン酸カルシウム中に導入する際に、カーボネートイオンの代わりに又はカーボネートイオンに加えて、単に例として、ニトレート、ニトリット、アセテート、 Mg^{+2} 及び $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ イオンのようなその他のイオン又はイオンの混合物が適し得ることが認められる。

非晶質リン酸カルシウム沈殿を収集しかつろ過した後には活性化してよい。この工程を、収集した沈殿の非晶質状態を保存するように、冷温室中で又は周囲以下の温度で行うのが好適である。収集は、典型的には、重力ろ過、真空ろ過又は遠心分離を含み、これらにいささかも限定しない任意の慣用手段によって実施することができる。収集された沈殿は、ゼラチン状であり、蒸留水で1回よりも多く

洗浄する。

洗浄した沈殿を、次いで物質の非晶質特性を維持する条件下で乾燥させる。凍結乾燥が適しているが、唯一の技術ではない。沈殿を凍結させ、かつ凍結させたままにしながら、乾燥させて同伴される液のバルクを除く。この手順は、凍結された沈殿を真空室中に所定の期間入れることによって行ってもよい。凍結乾燥は、典型的には、液体窒素温度において12～78時間の範囲、好ましくは約24時間の時間かつ $10^{-1} \sim 10^{-4}$ トルの範囲、好ましくは 10^{-2} トルの真空中で行われる。凍結乾燥において典型的に用いられる極低温は物質のそれ以上の結晶化を抑制することから、好適な方法は、凍結乾燥を含む。その結果、それによって得られる非晶質リン酸カルシウムは、極めて微細な自由流動性粉末である。

乾燥されたACPを、次いで活性化してよい。好適な実施態様では、カーボネートがACP中に存在する場合に、ACP粉末を加熱して残留する自由水及び水和の水を駆逐しかつ炭素を、おそらくは CO_3^{2-} を CO_2 及び酸素に分解することによって除く。加熱工程は、非晶質リン酸カルシウムを結晶性ヒドロキシアパタイトに転化させないように、500～600℃よりも低い425℃よりも高い温度で実施する。加熱は、温度450～460℃の範囲で、好ましくは1/2時間～6時間実施するのが好ましい。

結晶性及び部位空格子（多孔度及び／又は化学量論的变化）が低いことは、本発明の活性化された非晶質リン酸カルシウムの観測される反応性が一層高いことを説明する。これは、下記の観測によって例証される。525℃に加熱したカーボネート含有非晶質リン酸カルシウムは、結晶性ヒドロキシアパタイトの形成の増大を有しかつ対応する反応性の低下を有することが観測される。たった400℃に加熱しただけの非晶質リン酸カルシウムは、その非晶質特性を保留するが、反応性の低下を示す。おそらくは、この反応性の低下は、この低い温度で処理されたサンプルにおいてIRによって観測されるカーボネートレベルが高い（かつ部位空格子が少ない）ことに関係される。これらの知見は、非晶質性及び炭素含量の低減（空位の反応性部位）が、共に反応性の要因であることを示唆する。これは、決して反応性についての唯一のベースであることを意図しない。観測される反応性についてのその他のベースは、発明の範囲内であると考えられる。生成し

た非晶質リン酸カルシウム粉末は、 Ca/P 比1.1~1.9、好ましくは約1.55~1.65、最も約1.58を有する高度に反応性の非晶質リン酸カルシウム物質である。その粉末を、種々の分析技術によって特性表示した。

図1では、高分解能透過電子顕微鏡写真は、本発明の好適な反応性の非晶質リン酸カルシウム形態学的特性及びオンGSTロームサイズの性質を例示するのに示す。好適な粒子サイズは、1000オンGSTロームよりも小さい、好ましくは300~400オンGSTロームの範囲である。結晶性物質に対照して、明瞭な縁及び表面を欠いている、小球様クラスターを分離する不明瞭な境界に留意すること。

発明の反応性ACPの非晶質性は、既知の結晶性リン酸カルシウムに一致する回折角の任意の位置において鋭いピークが欠けているX線図形によって特性表示される(図4a)。波長分散型X線分析を使用して電子マイクロプローブで行った熱処理した後の同じ物質の Ca/P 測定は、 Ca/P が1.58であることを生じる(図2)。

これらの特性表示は、たとえ非晶質リン酸カルシウム固体における所定のグループの局部部分に変化が存在するとしても、総括の非晶質性がプロセス全体を通して維持されることを立証する。

別の好適な実施態様では、高度に反応性の非晶質リン酸カルシウムに第二のリン酸カルシウムを反応させてPCA物質を得る。上に検討した通りに、結晶性ヒドロキシアパタイトは、熱力学的に好適な反応生成物であり、かつ通常生理学的条件下で再吸収性でないと記載されている。急速かつ完全に転化して有意に結晶化しないでアパタイト性化合物を生成することができる非晶質リン酸カルシウムを使用することは、生理学的条件下で再吸収可能な結晶性不良のアパタイト系リン酸カルシウムへの新規なルートを提供する。

本発明の非晶質リン酸カルシウム粉末にプロモーターを混合し、それにより転化してPCA物質を形成してもよい。この反応は、粉末を種々の酸性及び塩基性リン酸カルシウムの両方のいずれかと限られた量の水、塩類液、緩衝溶液、血清又は組織培地(これらに限定されない)のような液の存在において混合する際に、室温において起き得る。本発明の非晶質リン酸カルシウムと第二リン酸カルシ

ウムとの混合物は、加える液の量に応じて、様々のペーストコンシステンシーの度台を有する極めて成形適性及び／又は極めて注入適性なペーストを生じる。

プロモーター及び／又はACPを調製する方法は、水和されたプリカーサーがPCA物質に転化される容易性に影響を与えることになる。上述したとおりに、液体を加える前に、反応体粉末を混合する方法は、系の反応性に影響を与える。これより、乳鉢及び乳棒を使用するハンド混合は、反応体粉末を長期に機械粉碎する程に反応性の系を生じない。従って、プロモーターを比較する場合に、標準化された調製条件を用いることが重要である。

ACPを反応性のPCAリン酸カルシウムに転化させることは、表面触媒される現象であることが仮定される。そうとすれば、再現可能な表面積を有する特定のプロモーターを製造するのが望ましくなり得る。ACP及びプロモーター粉末の比表面積を調節して反応条件及び最終のPCA物質特性を調節することができる。これより、反応再現性を調節するために、既知の粒度分布を有するプロモーターを提供するのが有利である。標準の篩技術が、特定の粒度を選定するために適している。表面積は、PCA物質の圧縮強度、おそらく多孔度及び再吸収性に相関されることが示された。

多数のカルシウム又はホスフェート含有化合物を、硬化反応において関与的プロモーターとして用いてよい。リン酸カルシウムプロモーターは、任意の結晶構造のものでよく、ACPと直接に又は増進用プロモーターを使用することによるのいずれかで反応性になるように選ぶべきである。好適な関与的プロモーターは、それら自体中間のPCAリン酸カルシウム相を通してヒドロキシアパタイトへの転化を受ける傾向にあるものである。

本明細書中に記載するACPに関してプロモーターとして使用するのに適したリン酸カルシウムは、中性、塩基性、及び酸性リン酸カルシウム、好ましくはアパタイト性ホスフェートを含み、これらは、アパタイト性リン酸カルシウムを得るための反応について適当な化学量論をもたらす。好適な実施態様では、酸性（pH 5～7）リン酸カルシウムを使用する。適したリン酸カルシウムは、下記を含むが、いささかもこれらに限定しない：メタリン酸カルシウム、リン酸二カルシウム二水和物、デカリン酸七カルシウム、リン酸三カルシウム、ピロリン酸カ

ルシウム二水和物、発明の結晶性不良のアパタイト性物質、ピロリン酸カルシウム、リン酸八カルシウム、リン酸四カルシウム及び更なるACP。単に例として、 CaO 、 CaCO_3 、酢酸カルシウム、及び H_3PO_4 のようなホスフェート又はカルシウムの源となるであろうその他の固体を混合して最終生成物を形成して約1.1~1.9、好ましくは約1.3~1.5に近い所望のCa/P比を生じてもよい。同様に、第二成分を非晶質又は結晶性不良の状態で供するのが望ましいかもしれない。

いくつかのリン酸カルシウムプロモーターを、弱いプロモーターか又は強いプロモーターのいずれかとして調製してよい。例えば、粒度 $100\sim125\mu\text{m}$ （又は例5における分布B3）の範囲を有するDCPDサンプルは、発明の高度に反応性のACPと所定の条件下で境界的だけで反応する（例5を参照）。この粒度のDCPDは、「弱く促進する」と考えることができる。これより、DCPDは、このフォーマットで高度に反応性のACPについてスクリーンするのに用いることができる。

発明のいくつかの実施態様では、反応が関与用第二リン酸カルシウムを採用してPCA物質を生成することは要求されない。むしろ、単に、反応に関与しない一種又はそれ以上の「不動の」プロモーター（また、「非反応性」又は「非関与性」プロモーターとも呼ぶ）を加えることによって硬化及び反応性ACPのPCA物質への転化を促進することは、発明の範囲内である。適した不動性プロモーターは、前にリン酸カルシウム物質のヒドロキシアパタイトへの転化を促進すると記載した物質又は処理を含み、これらに限定しない。例えば、水、熱、核形成剤及び触媒を不動性プロモーターとして用いることができる。いくつかの実施態様では、触媒は、表面積であって、その存在が硬化及びACPの結晶性不良のアパタイト系リン酸カルシウムへの転化を促進するものを供する。例えば、 Al_2O_3 、マイカ、ガラス及び砂が、取り分け有用な不動性物質である。好適な実施態様では、水に不溶性又は低い溶解度の、直径 $1\sim200\mu\text{m}$ の範囲の粒状形態で調製することができかつインビボで再吸収可能な物質プロモーターを採用する。これより、ポリL-乳酸（PLLA）及びポリグリコール酸（PGA）のようなポリマーが特に望ましいプロモーターである。

第二のリン酸カルシウムをプロモーターとして採用する場合に、それは、X線回折図形（図4b）において関心のあるリン酸カルシウムに典型的な鋭い回折ピークの存在によって立証される通りに、しばしば結晶性である。対照して、反応性のACPは、非晶質でありかつX線回折により識別可能なピークを示さない（図4a）。しかし、その結晶度が一層高いにもかかわらず、X線回折は、リン酸二カルシウムが反応性のACPとの反応において消費されかつ生成物PCA物質がずっと低い結晶度のものであることを示唆する。同様に、化学量論的HAを第二リン酸カルシウム源として採用する場合に、それもまた反応において消費されかつ低い結晶度のPCA物質が生成される。

反応体の内の少なくとも一種が非晶質でありかつ高度に反応性であることから、本発明の形成反応は室温において又はそれよりも高い温度において進行して結晶性不良の又は微結晶性のミクロ構造を有する硬化されたアパタイト性物質をもたらす。好適な実施態様では、転化反応もまた実質的に完全であり、それにより混合物のすべてのカルシウムホスフェートが、生成するPCA生成物によって消費されることを確実にする。この結果は、単に出発の非晶質及び第二のリン酸カルシウムの相対割合を選定することによってアパタイト性生成物の信頼できる製造を可能にする。カルシウム対ホスフェート比約1.2～1.68、好ましくは1.5未満、最も好ましくは約1.38を維持するのが望ましい。

生成物アパタイト性物質は、天然産の骨の特徴の不安定な環境を含有する。天然産の骨では、ミネラルは、ナノメートルサイズの構造を特徴とし、周囲の組織環境と相互作用するための高い表面積を備え、組織の再吸収及び改造を生じる。本発明は、生成物としてのそのナノメートルサイズの結晶により、天然産の骨ミネラルによく似ている。更に、結晶度やCa/Pのような性質を本発明において正確にデザインして骨のリビング組織において認められるミネラル性をシミュレートする。

発明の反応の間に生成されたPCAは、水和されたプリカーサー物質の硬化と関連付けられる。しかし、ACPプリカーサーの完全な転化は好適な実施態様であるが、水和されるプリカーサーの硬化は、完全な転化の前に又は完全な転化の不存在においてさえ起き得ることに留意すべきである。そのような一部転化する

が、それでも硬化する反応は、発明の範囲内であると考える。

上述した通りに、乾燥ACPとその他の反応体及び限られた量の水溶液とを組み合わせると、水和されたプリカーサーを生成する。反応体に加えるべき適当な量の液を選定することにより、粘度を要求に応じて調整することができる。水和されたプリカーサーは、注入適性又は成形適性なコンシステンシーのいずれかを有して調製することができる。注入適性なコンシステンシーとは、依然16～18ゲージ針を通過することができながら、できるだけ濃いことを意味する。これは、「練り歯磨き」様コンシステンシーになるのが最もしばしばである。成形適性なとは、物質にその形状を保留させるコンシステンシーを言う。成形適性なコンシステンシーの極端な場合は、水和されたプリカーサーは、艶出し用パテ又はコーキングコンパウンドのコンシステンシーを有することになる。水和されたプリカーサーは、また、丁度注入適性及び成形適性の両方になる程の液で調製してもよい。物質は、ペースト形態で、従来技術の組成物に勝る顕著に改良された流動特性を有する。流動特性は、練り歯磨き様であり、一方、従来技術の物質は、粒状又はオートミール様コンシステンシーを示すのが普通である。水和されたプリカーサーは、使用する前、室温に保ちかつ蒸発を最少にするならば何時間かの期間までに、調製することができる。貯蔵時間は、蒸発損失を最少にする工程を取りさえすれば、ペーストを冷蔵庫内で1～10℃の範囲の低い温度に保つことによって伸ばすことができる。

いくつかの好適な実施態様（例えば、下記の例9～14）では、反応は、吸熱であり、室温においてゆっくり起きるが、体温において有意に促進される。これは、外科的場面において特に有用である、というのは、反応体と水とを混合することによって形成されるペーストは、室温に又はそれよりも低い温度に保ちながら、相当の期間（何時間かまで）注入適性なままである。これより、ペーストは、室温（およそ22℃）において、1時間よりも長い時間経過後に硬化しかつ10分よりも長い間、好ましくは1時間よりも長い間、最も好ましくは3時間よりも長い間成形適性及び／又は注入適性なままである。移植部位（およそ37℃）に注入した後に、ペーストは、約1時間よりも短い時間で、好ましくは約10～30分で硬化する。

複合材及び添加剤

本発明のPCA物質は、他の物との複合材として形成してよい。複合材は、下記を含み、これらに限定しないビヒクルの任意の数の物理的パラメーターを変えるのに望ましくなり得る：強度、再吸収時間、付着力、注入適性、摩擦特性、又は治療剤輸送能力又は放出速度論。複合材加工の分野の当業者ならば、複合材加工において重要な方法及び概念を理解すると思う。PCA物質複合材を調製するための更なるガイダンスは、本願と同じ日付けで出願した、「Bioresorbable Ceramic Composites」なる表題の同時継続中の米国特許出願において得ることができ、同米国特許出願を本明細書中に援用する。

インビトロ移植成形

発明の移植片は、ペースト形態で外科適用するのに加えて、体外で予備成形し、硬化し、固体形態で移植してもよい。予備成形したデバイスを、ハンドで造形、成形又は機械加工してもよい。治療剤を入れることは、薬剤を、水和されたブリカーサーを調製するのに用いる緩衝液又はビヒクルに直接加えることによって達成してもよい。別法として、硬化した後に、ビヒクルを、浸漬、ローリング又はスプレーコート法を使用して治療剤に暴露してもよい。

生物学的に活性な薬剤

任意の生物学的に有用な薬剤を発明のPCA物質移植片から送達することができる。唯一の要件は、物が加工する間その物質の存在において活性なままであり或は次いで活性化又は再活性化することができることであるのが普通である。発明のペーストは、多数の水性ビヒクル及び代用品によって調製することができるので、当業者ならば、薬剤の安定性を改良するためにどの特定の添加剤を入れることができるかを良く知っていると思う。特定の薬剤の発明の物質との安定性及び／又は適合性、並びに加工戦略は、インビトロで実験的にテストすることができる。詳細には、薬剤は、本明細書中に記載する方法の内の一つ又はそれ以上に

よって発明の物質中に組み込むことができる。ビヒクルを37℃で硬化させた後に、物を物質から水又は適当な緩衝液のような分析媒体中に浸出させ、コンパウ

ンドを物質から拡散により分析媒体中に収集することができる。次いで、分析媒体を活性な薬剤の存在について分析することができる。物質を砕く、粉碎する、又はその他の方法で分解した後に、分析媒体を接触させることになる例がいくつかある。物質上での細胞の成長のような、薬剤拡散を必要としないその他の分析方法或はその他の物理的、化学的又は生物学的アセイは、特定のコンパウンドについて実施者に知られていると思う。

本発明の実施において有用な生物学的に活性な薬剤は、生物学的活性を有する任意の物質を含み、下記を含む：有機分子、タンパク質、ペプチド、核酸、核蛋白、多糖、糖タンパク質、リポタンパク質、並びにそれらの合成的及び生物工学的に作り出された類似物。生物学的作用を有する化学的薬剤（例えば、抗生物質、染料、等）も含む。タンパク質は、合成的、生化学的又は組み換え技術によって調製することができる。生物学的に活性な薬剤は、必要なことではないが、適当な政府の機関又は組織体により使用について安全かつ有効と見なされたものであるのが好ましい。例えば、合衆国においてヒト使用について承認された薬物は、食品医薬品局（FDA）により21 C. F. R. ss 330.5、331～361、及び440～460でリストされており；合衆国において獣医使用について承認された薬物は、FDAにより21 C. F. R. ss 500～582でリストされている。

「生物学的に活性な薬剤」なる用語は、動物、植物、又はウイルスにおいて局部性又は全身性の作用を生じる薬物学的に活性な物を含む。すなわち、その用語は、疾患の診断、治療、緩和、処理又は予防において或は望ましい身体的又は精神的発達の増進及び動物、植物、又はウイルスにおける状況において使用するために意図する任意の物を意味する。本明細書中で用いる「動物」なる用語は、霊長類（ヒトを含む）のような哺乳動物、羊、馬、牛、豚、犬、猫、ラット及びマウス；鳥類；は虫類；昆虫類；くも類；原生生物（例えば、原生動物）；並びに原核バクテリアを意味するのに採用する。

本発明の送達ビヒクルに入れることができる生物学的に活性化化合物のクラスは、下記を含むが、これらに限定しない：抗エイズ物質、制ガン物質、抗生物質

、ACE抑制剤、抗原、アドレナリン作動拮抗薬、制酸剤、免疫抑制剤、抗ウイルス物質、酵素抑制剤、神経毒、オピオイド、催眠剤、抗ヒスタミン薬、滑剤、精神安定剤、抗けいれん薬、筋弛緩薬及び抗パーキンソン物質、鎮けい薬及び筋収縮剤、抗下痢止め剤、制吐薬、緩下薬、利尿薬、縮瞳薬及び抗コリン作用薬、抗緑内障化合物、駆虫及び／又は抗原虫化合物、抗高血圧症薬、鎮痛剤、解熱薬、抗炎症剤、抗ヒスタミン薬、咳止め剤、抗めまい剤、アンチナーチジック (antinetigic) 及び抗乗物酔い薬剤、局部麻酔剤、眼薬、プロスタグランジン、抗うつ薬、抗精神病物質、制吐薬、イメージング剤、特異的標的剤、栄養因子、成長因子、免疫抑制剤、免疫活性剤、抗有糸分裂性神経伝達物質、タンパク質、細胞応答調節剤、ワクチン、核酸、遺伝子、遺伝子断片、遺伝子調節配列 (プロモーター、エンハンター、又はその他の調節部位のような)、アンチセンス分子、及びその他の生合成経路の生活性な部分又は成分。

本発明に従って送達ビヒクルに入れるのに適した化合物のクラスの一層完全なリスティングは、Pharmazeutische Wirkstoffe (Von Kleemann等 (編集)、シュトゥットガルト、ニューヨーク、1987) に、或はLippincott's Illustrated Pharmacology Reviews (Harvey等 (編集)、J. B. Lippincott Co.、フィラデルフィア、1992) 又はExamination & Board Review Pharmacology (Katzin等、Appleton & Lange、コネチカット、1993) のような種々の入手し得る薬物学テキストブックに見出すことができ、これらの各々を本明細書中に援用する。特定の生物学的に活性な物の例を下記に提示する：

脈管形成因子は、血管系の成長を刺激する物であり、vegfのような化合物、並びにいくつかの成長因子及びマイトジェンを含む。

抗エイズ物質は、自己免疫欠乏症候群 (AIDS) を治療又は予防するのに用いる物である。そのような物の例は、CD4、3'-アジド-3'-デオキシチミジン (AZT)、9-(2-ヒドロキシエトキシメチル)-グアニンアシルクロバー (acyclovir)、ホスホノペニシリン、1-アダマンタンアミン、ペ

プチドT、及び2'，3'ジデオキシシチジンを含む。

制ガン物質は、ガンを治療又は予防するのに用いる物である。そのような物の例は、下記を含む：アンチメタボライト（例えば、メトトレキセート、フルオロウラシル、5-フルオロウラシル、シタラビン（cytarabine）、メルカプトプリン、6-メルカプトプリン、6-チオグアニンのような）、抗生物質（例えば、ダウノルビシン、ドクソルビシンのような）、アルキル化剤（例えば、メクロレタミン、シクロホスファミド、ウラシルマスタード、ブスルファン、カルムスチン、ロムスリンのよう）、紡錘体毒（例えば、ビンブラスチン、ビンクリスチンのような）、ホルモン（例えば、ヒドロキシprogesteron、メドロキシprogesteronアセテート、医師処方のアセテート、ジェチルスチルベストロール、テストステロンプロピオネート、フルオキシメステロンのような）、及びその他の薬剤（例えば、ビンデシン、ヒドロキシ尿素、プロカルバジン、アミノグルテチミド、メルファラン、クロラムブシル、アカルバジン（DTIC：ジメチルトリアゼノミダゾールカルボキシアミド）、シトシンアラビノキド）。

抗生物質は、当分野で認識されており、微生物の成長を抑制する又は微生物を殺す物である。抗生物質は、合成的に又は微生物によって製造することができる。抗生物質の例は、下記を含む：アミノグリコシド（例えば、ゲンタマイシン、トブラマイシン、ネチルマイシン、ストレプトマイシン、アミカシン、ネオマイシン）、バシトラシン、コルバペネム（例えば、イミペネム/シスラスタチン）、セファロスポリン、コリスチン、メセナミン、モノバクタム（例えば、アズトレオナム）、ペニシリン（例えば、ペニシリンG、ペニシリンV、メチシリン、ナトシリン、オキサシリン、クロキサシリン、ジクロキサシリン、アンピシリン、アモキシリン、カーペニシリン、チカルシリン、ピペラシリン、メズロシリン、アズロシリン）、ポリミキシンB、キノロン、及びバンコマイシンのような殺菌剤；並びにクロラムフェニコール、クリンダミアン、マクロライド（例えば、エリトロマイシン、アジトロマイシン、クラリトロマイシン）、リンコミアン、ニトロフラントイン、スルホナミド、テトラサイクリン（例えば、テトラサイクリン、ドキシサイクリン、ミノサイクリン、デメサイクリン）、及びトリメトプリムのような静菌剤。また、メトロニダゾール、フルオロキノロン、及びリタン

ピンも含む。抗生物質は、時には不溶性形態で供し、これは、遅延送達を所望する場合に用いることができる。

抗ウイルス剤は、ウイルスの複製を破壊する又は抑制することができる物である。抗ウイルス剤の例は、下記を含む： α -メチル- β -アダマンタンメチルアミン、1-D-リボフラノシル-1, 2, 4-トリアゾール-3カルボキシアミド、9-[2-ヒドロキシエトキシ]メチルグアニン、アダマンタンアミン、5-ヨード-2'-デオキシウリジン、トリフルオロチミジン、インターフェロン、及びアデニンアラビノシド。ヘルペスウイルスの治療において有用な特定の薬剤は、アシクロバー、ピダラビン、イドクスウリジン、及びガンシクロバーを含む。

酵素抑制剤は、酵素反応を抑制する物質である。酵素抑制剤の例は、下記を含む：エドロホニウムクロリド、N-メチルフィゾスチグミン、ネオスチグミンブロミド、フィゾスチグミンサルフェート、タクリンHCl、タクリン、1-ヒドロキシマレエート、ヨードツベルシジン、p-プロモテトラミゾール、10-(α -アルファ-ジエチルアミノプロピオニル)-フェノチアジンヒドロクロリド、カルミダゾリウムクロリド、ヘミクロリニウム-3, 3, 5-ジニトロカテコール、ジアシルグリセロールキナーゼインヒビターI、ジアシルグリセロールキナーゼインヒビターII、3-フェニルプロパルギルアミン、N⁶-モノメチル-L-アルギニンアセテート、カルビドパ、3-ヒドロキシベンジルヒドラジンHCl、ヒドララジンHCl、クロルギリンHCl、デブレニルHCl、L(-), デブレニルHCl、D(+)-, ヒドロキシルアミンHCl、イプロニアジドホスフェート、6-MeO-テトラヒドロ-9H-ピリド-インドール、ニアラミド、パルギリンHCl、キナクリンHCl、セミカルバジドHCl、トラニルシプロミンHCl、N-ジエチルアミノエチル-2, 2-ジフェニルバレレートヒドロクロリド、3-イソブチル-1-メチルキサンソン、パラベリンHCl、インドメタシンド、2-シクロオクチル-2-ヒドロキシエチルアミンヒドロクロリド、2, 3-ジクロロ- α -メチルベンジルアミン(DCMB)、8, 9-ジクロロ-2, 3, 4, 5-テトラヒドロ-1H-2-ベンズアゼピンヒドロクロリド、p-アミノグルテチミド、p-アミノグルテチミドタートレート、R(

十) ー, p-アミノグルテチミドタートレート、S (ー) ー, 3-ヨードチロシン、アルファ-メチルチロシン、L-ー, アルファ-メチルチロシン、DL-ー, アセタゾルアミド、ジクロルフェナミド、6-ヒドロキシ-2-ベンゾチアゾールスルホナミド、及びアロプリノール。

神経毒は、神経系、例えば神経細胞に対するそれらの作用を通して毒作用を有する物質である。神経毒は、アドレナリン作動性神経毒、コリン作動性神経毒、ドーパミン作動性神経毒、カルシウムチャネルブロッカ、及びその他の神経毒を含む。アドレナリン作動性神経毒の例は、N-(2-クロロエチル)-N-エチル-2-プロモベンジルアミンヒドロクロリドを含む。コリン作動性神経毒の例は、アセチルエチルコリンマスタートヒドロクロリドを含む。ドーパミン作動性神経毒の例は、6-ヒドロキシドーパミンHBr、1-メチル-4-(2-メチルフェニル)-1, 2, 3, 6-テトラヒドロピリジンヒドロクロリド、1-メチル-4-フェニル-2, 3-ジヒドロピリジニウムペルクロレート、N-メチル-4-フェニル-1, 2, 5, 6-テトラヒドロピリジンHCl、1-メチル-4-フェニルピリジニウムヨージドを含む。カルシウムチャネルブロッカの例は、 Ω -コナトキシン及びベラパミルを含む。

オピオイドは、阿片に由来しない阿片剤様作用を有する物である。オピオイドは、オピオイド作用薬及びオピオイド拮抗薬を含む。オピオイド作用薬は、コデインスルフェート、フェンタニルシトレート、ヒドロコドンバイタートレート、ロペラミドHCl、モルヒネスルフェート、ノスカピン、ノルコデイン、ノルモルヒネ、テバインを含む。オピオイド拮抗薬は、n o r-ビナルトルフィミンHCl、ブプレノルフィン、クロルナルトレキサミン2HCl、フナルトレキサミンHCl、ナルブフィンHCl、ナロルフィンHCl、ナロキソンHCl、ナロキソナジン、ナルトレキソンHCl、及びナルトリンドールHClを含む。

催眠剤は、催眠作用を生じる物である。催眠剤は、ペントバルビタールナトリウム、フェノバルビタール、セコバルビタール、チオペンタール及びこれらの混合物、複素環式催眠剤、ジオキソピペリジン、グルタルイミド、ジエチルイソバレラミド、 α -プロモイソバレリル尿素、ウレタン及びジスルファンを含む。

抗ヒスタミン薬は、ヒスタミンの作用を完全に抑制する物である。例は、ピリ

ラミン、クロルフェニラミン、テトラヒドラゾリン、等を含む。

滑剤は、それらが送達される環境の滑性を増大させる物質である。生物学的に活性な滑剤の例は、水及び塩類液を含む。

精神安定剤は、鎮静作用をもたらす物質である。精神安定剤の例は、クロロプロマジン、プロマジン、フルフェナジン、レセルピン、デセルピジン、及びメプロバメートを含む。

抗けいれん薬は、けいれんを予防する、低減させる、又は除く作用を有する物である。そのような薬剤の例は、プリミドン、フェニトイン、バルプロエート、Chk及びエトスクシミドを含む。

抗炎症薬は、炎症を抑制する化合物である。異なるタイプの抗炎症薬剤は、異なる化学的媒介物をブロックする。抗炎症剤の例は、抗炎症性、鎮痛性、及び解熱性活性を有する、アスピリン、フェニルブタゾン、インドメタシン、スリンダク、トルメチン、イブプロフェン、ピロキシカム、フェナメートのような非ステロイド系抗炎症薬剤（NSAIDs）を含む。また、抗炎症活性は弱い、アセトアミノフェンやフェナセチンのような非麻酔性の鎮痛剤も含む。金塩、クロロキン、D-ペニシリン、及びメトトレキサートのような所定の活性ののろい抗炎症薬は、関節炎の治療において有用である。痛風特異的抗炎症薬は、コルヒチン、アロプリノール、プロベネシド、及びスルフィンピラゾンを含む。

筋弛緩薬及び抗パーキンソン剤は、筋肉を弛緩させる或はパーキンソン病に伴う症状を低減又は除く薬剤である。そのような薬剤の例は、メフェネシン、メトカルボマル、シクロベンザプリンヒドロクロリド、トリヘキシルフェニジルヒドロクロリド、レボドパ/カルビドパ、及びピペリデンを含む。

鎮けい薬及び筋収縮剤は、筋肉発作又は収縮を予防又は和らげることができる物である。そのような薬剤の例は、アトロピン、スコポラミン、オキシフェノニウム、及びパパベリンを含む。

縮瞳薬及び抗コリン作用薬は、気管支拡張を引き起こす化合物である。例は、エコチオフェート、ピロカルピン、フィゾスチグミンサリチレート、ジイソプロピルフルオロホスフェート、エピネフリン、ネオスチグミン、カルバコール、メタコリン、ベタネコール、等を含む。

抗緑内障化合物は、ベタキサロール、ピロカルピン、チモロール、チモロール塩、並びにチモロール、及び／又はその塩とピロカルピンとの組合せを含む。

駆虫、抗原虫及び抗真菌薬は、下記を含む：イベルメクチン、ピリメタミン、トリスルファピリミジン、クリンダマイシン、アンフォテリシンB、ナイスタチン、フルシトシン、ケトカナゾール、フルコナゾール、ナタマイシン、ミコナゾール、メトロニダゾール、ジロキサニドフロエート、パロモイシン、クロルキン、エメチン、デヒドロエメチン、ナトリウムスチボグルコナート（リーシュマニア症について）、メラルソプロール（トリパノソーマ症について）、ニフルチモックス（トリパノソーマ症について）、スラミン（トリパノソーマ症について）、ペンタミドン（トリパノソーマ症について）、及び抗マラリア性剤（例えば、プリマキン、クロロキン、キニーネ、メフロキン、ピリメタミン、及びクロルグアニドのような）。

抗高血圧症薬は、高い血圧に反作用することができる物である。そのような物の例は、アルファーメチルドパ及びアルファーメチルドパのピバロイルオキシエチルエステルを含む。

鎮痛剤は、痛みを予防する、低減させる、又は軽減することができる物であり、解熱薬は、熱を軽減する又は低減させることができる物である。そのような物の例は、アスピリン、フェニブタゾン、イドメタシン、スリンダク、トルメチック、イブプロフェン、ピロキシカム、フェナメート、アセトアミノフェン、フェナセチン、モルヒネスルフェート、コデインスルフェート、メペリジン、及びナロルフィンを含む。

局部麻酔剤は、局部領域において麻酔作用を有する物質である。そのような麻酔剤の例は、プロカイン、リドカイン、テトラカイン及びジブカインを含む。

眼薬は、ナトリウムフルオレセイン、ローズベンガル、メタコリン、アドレナリン、コカイン、及びアトロピンのような診断剤を含む。眼科外科添加剤は、アルファーキモトリプシン及びヒアルロニダーゼを含む。

プロスタグランジンは、当分野で認識されており、種々の生物学的作用を有する天然産の化学的に関連した長鎖ヒドロキシ脂肪酸のクラスである、

抗うつ薬は、うつ病を予防又は軽減することができる物である。抗うつ薬の例

は、イミプラミン、アミトリプチリン、ノルトリプチリン、プロトリプチリン、デシプラミン、アモキサピン、ドキシセピン、マプロチリン、トラニルシプロミン、フェネルジン、及びイソカアルボキサジドを含む。

抗精神病物質は、精神病挙動を改質する物である。そのような薬剤の例は、フェノチアジン、ブチロフェノン及びチオキサンテンを含む。

制吐薬は、吐き気又はおう吐を予防又は軽減する物である。そのような物の例は、ドรามミンを含む。

イメージング剤は、所望の部位、例えば腫瘍をインビボでイメージすることができる薬剤である。イメージング剤の例は、インビボで検出可能な標識を有する物質、例えば蛍光標識に結合させた抗体を含む。抗体なる用語は、抗体全体又はそれらの断片を含む。

特異的標的剤は、治療剤を所望の部位、例えば腫瘍に送達し、治療作用をもたらすことができる物である。標的剤の例は、有利な作用をもたらす毒素又はその他の薬剤を運ぶことができる薬剤を含む。標的剤は、毒素、例えばリシンAに結合させた抗体又は薬物に結合させた抗体にすることができる。

神経伝達物質は、興奮時の神経細胞から放出され、移動して標的細胞を抑制するか又は興奮させるかのいずれかをする物である。神経伝達物質の例は、ドーパミン、セロトニン、 γ -アミノ酪酸、ノレピネフリン、ヒスタミン、アセチルコリン、及びエピネフリンを含む。

栄養因子、成長因子、及び細胞応答調節剤は、因子であって、それらの連続した存在が、細胞の生育可能及び寿命を改良するものである。それらが走化性作用を生じ、或は毒素又は神経毒素に対し、又は神経退化に対して保護作用を有する場合がいくつかある。適したそのような因子は、下記を含むが、これらに限定しない：血小板由来成長因子（PDGF）、好虫球活性化タンパク質、単核細胞化学誘引性タンパク質、マクロファージ炎症性タンパク質、血小板因子、血小板塩基性タンパク質、及びメラノーマ成長刺激活性；表皮細胞成長因子、形質転換成長因子（アルファ）、線維芽細胞成長因子、血小板由来内皮細胞成長因子、インシュリン様成長因子、グリア由来成長神経因子、毛様体神経因子、神経成長因子、並びに骨成長／軟骨誘導因子（アルファ及びベータ）、又はその他の骨形態形

成タンパク質。

その他の細胞応答調節剤は、下記である：インターロイキン1～インターロイキン10を含む、インターロイキン、インターロイキンインヒビター又はレセプター；アルファ、ベータ及びガンマを含む、インターフェロン；エリスロポエチン、顆粒球コロニー刺激因子、マクロファージ刺激因子及び顆粒球マクロファージコロニー刺激因子を含む、造血因子；アルファ及びベータを含む、腫瘍壊死因子；ベータ-1、ベータ-2、ベータ-3、インヒビン、及びアクチビンを含む、形質転換成長因子（ベータ）；並びにOP-1、BMP-2及びBMP-7のような骨形態形成タンパク質。

ホルモンは、下記を含む：エストロゲン（例えば、エストジオール、エストロン、エストリオール、ジェチルスチベストロール、キネストロール、クロロトリアニセン、エチニルエストジオール、メストラノールのような）、抗エストロゲン（例えば、クロミフェン、タモキシフェンのような）、プロゲステン（例えば、メドロキシプロゲステロン、ノレチンドロン、ヒドロキシプロゲステロン、ノルゲストレルのような）、抗黄体ホルモン（ミフェプリストン）、アンドロゲン（例えば、テストステロンシピオネート、フルオキシメステロン、ダナゾール、テストラクトンのような）、及び抗男性ホルモン（例えば、シプロテロンアセテート、フルタミドのような）。ホルモンは、ホルモン置換治療用に及び／又は産児制限の目的に用いられるのが普通である。プレドニソンのようなステロイドもまた免疫抑制薬及び抗炎症薬として用いられる。ステロイドホルモンの送達は、エステル化によって遅延させることができる。甲状腺ホルモンは、トリヨードチロン、チロキシン、プロピルチオウラシル、メチマゾール、及びヨージキソド（iodixode）を含む。脳下垂体ホルモンは、コルチコトロピン、スマトトロピン、オキシトシン、及びバソプレッシンを含む。

核酸は、一種又はそれ以上のヌクレオシド及び／又はヌクレオチドを含む、DNA又はRNA分子を含む分子である。カルシウム化合物は、いくつかの系において細胞移入及びDNA吸収を促進するのが知られているので、本送達デバイスの再吸収は、移入効率を向上し得ることが期待される。核酸分子は、ワクチンとして又は例えば、アンチセンス剤として送達することができる。別法として、D

NA分子は、遺伝子治療において使用するために調製することができ、かかる遺伝子治療において、分子は、DNA分子を導入するつもり細胞において遺伝的エラーを矯正する又は補正することができる。

上にリストした薬剤を送達するための標準のプロトコル及びレジメンは、分野において知られている。これらのプロトコルは、経口又は静脈送達をベースにするのが典型的である。本発明が代わりの送達モードをもたらす程度に、これらのプロトコルへの変更が適し得る。

生物学的に活性な薬剤を、本発明のPCA物質から提供される送達ビヒクル中に、それを形成する間又はそれを形成した後に導入する（例20～21を参照）。薬剤を簡便にペースト中に混合した後にセットすることができる。別法として、ビヒクルを造形しかつ硬化させ、次いで溶液中の治療剤に暴露してもよい。この特別のアプローチは、アパタイト性物質に対して親和力を有することが知られているタンパク質において特に良く適している。生物学的に活性な薬剤を含有する緩衝溶液を、水の代わりに水溶液として用い、該水溶液中で、非晶質リン酸カルシウムを本発明の合成の結晶性不良のアパタイト性物質に転化させる。緩衝液は、任意のpH範囲で用いてよいが、5.0～8.0の範囲で用いることになるが最もしばしばであり、好適な実施態様では、pHは、所望する治療剤の長期の安定性及び効力と適合することになり、最も好適な実施態様では、pHは、5.5～7.4の範囲になる。適した緩衝液は、Tris、HEPES、やMOPSのようなカーボネート、ホスフェート（例えば、食塩加リン酸緩衝液）、及び有機緩衝液を含むが、これらに限定しない。緩衝液は、その宿主組織との生物適合性及びその治療剤との適合性について選ぶことになるが最もしばしばである。核酸、ペプチド又は抗生物質のほとんどは、簡単な食塩加リン酸緩衝液が十分になる。

生物学的に活性な薬剤は、適当な用量の薬剤を移植部位に送達するのを可能にする量でビヒクル中に導入する。ほとんどの場合に、用量は、実施者に知られておりかつ当該特定の薬剤に適用し得るガイドラインを用いて決める。レセプターに結合するそれらの薬剤について、レセプター-薬剤複合体の解離定数に比べておよそ1～2倍高い局部レベルを達成するのが通常好適である。配合レベル、デ

バイスサイズ、及び再吸収特性は、製薬工業において一般的な通りに、動物モデル及びヒト効力研究を用いることによって実験的に求めることができる。

一般的にセラミックデバイス、特にリン酸カルシウム材料に比べて、本送達物質の利点の内の一つは、それを穏和な反応条件下で形成することができることである。例えば、リン酸カルシウムベースのセラミックス（例えば、ヒドロキシアパタイト）は、それらが生物適合性でありかつタンパク質薬剤に対して親和性であることが知られていることから、潜在的な薬物送達材料として大いに研究されてきたが、そのような物質は、多くの治療剤に対して有害な作用を有するプロセスにおいて調製されるのが典型的である。例えば、500℃よりも高い温度で焼結することを要する方法がいくつかあり、他の方法は、酸性条件を用いることを要し、更に他の方法は、治療剤を含有する結晶を成長させるのに長い期間を要する。対照してみると、本合成のPCA薬物送達ビヒクルは、周囲温度及び生理学的に関連するpHにおいて調製することができる（例4を参照）。よって、標準のリン酸カルシウム材料を調製する間に破壊され得る広い範囲の生物学的に活性な材料を本発明の薬物送達物質中に組み込むことができる。特にタンパク質薬剤は、熱やその他の不都合な条件に感応性であるのがしばしばであり；本合成のPCA物質は、従ってタンパク質薬剤用の特に改良された送達系を構成する。

細胞

発明のPCA物質を細胞播種用途において利用するつमोरの場合には、水和されたプリカーサーを生理的媒体である水溶液で調製するのが好ましい。そのような媒体の例は、当分野において良く知られており（例えば、ダルベッコの最小必須媒体；食塩加リン酸緩衝液；及びカーボネート、TRIS、又はHEPES緩衝液）；当業者ならば、所望する細胞タイプと適合し得る特定の媒体を知っている。

水和されたプリカーサーを水よりもむしろ緩衝水溶液で調製することが必須でないのはもちろんである。しかし、細胞成育可能性を維持することが望ましいので、水（又はその他の最小水溶液）を使用して調製した水和されたプリカーサー又は硬化されたPCA物質を、それを細胞に暴露する前に、又は少なくともそれ

を細胞に暴露すると同時に、成長媒体に暴露することにするのが好ましい。物質を動物中に導入することは、物質を成長媒体に（及び細胞に）暴露することを構成することができる。

本発明のPCA物質は、種々の添加剤の内の任意のものと共に調製してよく、及び／又は複合材として調製してもよい。望ましいPCA物質複合材の例については、本願と同じ日付で出願した「Bioactive Ceramic Composites」なる表題の米国出願を参照；細胞播種する前又は細胞播種した後にはPCA物質中に組み込むことができる生物学的に活性な材料の例については、本願と同じ日付で出願した「Delivery Vehicle」なる表題の米国出願を参照。細胞成長、分化、及び／又は局在に影響を与えることができる因子、例えばラミニン、フィブロネクチン、コラーゲン、マトリゲル及びその成分、及びその他の成長因子並びに細胞外マトリックス成分をPCA物質に加えることが特に望ましくなる場合がいくつかある。

細胞

発明のPCA物質に、種々の細胞の内の任意のものを播種してよい。「細胞」は、本発明に従えば、一次組織外植片及びそれらの製剤、分離された細胞、細胞株（形質転換された細胞を含む）、及び宿主細胞を含む、リビング細胞の任意の製剤である。自己細胞を用いるのが好ましいが、異種の、異質遺伝子型の、又は同系の細胞もまた有用である。細胞が自己由来でない場合、拒絶を最少にするために、免疫抑制を投与するのが望ましくなり得る。好適な実施態様では、そのような薬剤を、播種された組成物内に入れて、薬剤の有効な局部濃度を確実にしつつそれらの投与の全身系作用を最少にすることができる。用いる細胞は、一次細胞でも、外植片でも、又は細胞株でもよく、分裂細胞でも又は非分裂細胞でもよい。細胞は、半ピボで拡大させた後に発明のPCA物質中に導入してよい。自己細胞は、十分な数の生細胞が宿主から収穫されることができないならば、このようにして拡大させるのが好ましい。

本発明のPCA物質に播種するのに、リビング細胞の任意の製剤を使用してよい。例えば、培養された細胞又は分離された個々の細胞を使用してよい。別法として又は加えて、ある内部構造を有する組織を含む組織の片を使用してよい。

細胞は、一次組織外植片及びそれらの製剤でも、細胞株（形質転換された細胞を含む）でも、又は宿主細胞でもよい。細胞が宿主細胞でありかつ細胞を発明のPCA物質中にインビボで導入する場合（下記を参照）、好適な細胞源は、骨膜又は軟骨膜の内層、選定の細胞を含有する血液又はその他の液、及びそのような細胞を含む損傷された宿主組織（特に骨又は軟骨）を含むが、これらに限定しない。

本発明において用いるための細胞を収穫、維持、拡大、及び調製するのに、任意の利用可能な方法を採用してよい。そのような手順について記載している有用な文献は、例えば Freshney, Culture of Animal Cells; a Manual of Basic Technique, Alan R. Liss Inc., ニューヨーク、NYを含み、同文献を本明細書中に援用する。

発明のPCA物質は、硬質又は軟質組織を生成するための骨組みとして有用である。その物質中に組み込むことができる組織産生又は組織分解細胞は、下記を含むが、これらに限定しない：軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、間葉幹細胞、その他の骨又は軟骨産生細胞又は細胞株、線維芽細胞、筋細胞、肝細胞、実質細胞、腸原の細胞、神経細胞、及び皮膚細胞。

そのような組織産生又は組織分解細胞及び／又はそれらのプリカーサーを分離及び培養する方法は、当分野において知られている（例えば、Vacanti等の米国特許第5,041,138号；Elgendy等、Biomater. 14:263, 1993；Laurencin等、J. Biomed. Res. 27:963, 1993；Freed等、J. Cell. Biochem. 51:257, 1993；Atala等、J. Urol. 150:745, 1993；Ishaug等、J. Biomed. Mater. Res. 28:1445, 1994；Chu等、J. Biomed. Mater. Res. 29:1147, 1995；Thomson等、J. Biomater. Sci. Polymer Edn. 7:23, 1995を参照、これらの各々を本明細書中に援用する）。

例えば、間葉幹細胞は、種々の間葉又は結合組織（例えば、脂肪の、骨性、軟

骨質、弾性、及び繊維質結合組織を含む)に分化することができ、既知の技術に従って分離、精製、及び複製することができる(Caplan等、米国特許第5,486,359号;Caplan等、米国特許第5,226,914号;Dennis等、Cell Transplantation 1:23,1992を参照、これらの各々を本明細書中に援用する)。そのような間葉細胞は、リン酸三カルシウム及びヒドロキシアパタイトキャリアーに関連して研究されてきかつそのようなキャリアー内からうまく分別することができるのが判明された(Caplan等、米国特許第5,197,985号を参照、これを本明細書中に援用する)。同様の手順を本発明のPCA物質骨組内の直接の間葉細胞分別に採用する。

本発明は、組織産生性細胞を使用することに限定しないのももちろんである。発明の所定の好適な実施態様は、主に発明のPCA物質が、組織再生用途(特に骨及び/又は軟骨の成長を伴うものに関して)に非常に良く適していることから、そのような細胞を利用する。任意の細胞を発明のPCA物質中に播種してよい。その他の細胞を更に組織産生性細胞と共に入れるのが望ましくなる場合がいくつかある。

発明のPCA物質中に播種する細胞は、例えば特定の用途において有用なタンパク質又はその他の因子を生成するために、遺伝子的に作り出してもよい。好適な実施態様では、細胞を処理して宿主免疫攻撃及び拒絶への耐性を付与する分子を製造してもよい。Fas-L及びCR-I遺伝子は、そのような有用な遺伝子の例である。

その他の成分

発明のPCA物質を細胞播種用途において使用する場合に、一種又はそれ以上の添加剤を、播種する前又は播種した後に、PCA物質中に導入してよい。発明の所定の好適な実施態様では、一種又はそれ以上の生物学的に活性な薬剤をPCA物質中に組み込む。そのような生物学的に活性な薬剤の検討及びそれらを発明のPCA物質と共に使用することについては、本願と同じ日付で出願した「Delivery Vehicle」なる表題の米国出願を参照。

本発明の播種されたPCA物質組成物において用いるための好適な生物学的に

活性な薬剤は、細胞成長、分化、移動及び／又は局在に影響する因子を含む。例えば、骨マトリックスは、細胞挙動に影響する種々のタンパク質因子を含有する（例えば、Hubbell, Bio/Technology 13:565, 1995; Caplan等、米国特許第4,609,551号; Caplan等、米国特許第4,620,327号を参照）。

また、細胞マトリックス成分は、分裂、分化、移動、及び局在において重要な役割を果たすことができる（例えば、Hubbell, Bio/Technology 13:565, 1995を参照）。従って、そのような細胞マトリックス成分を本発明の播種されたPCA物質内に局在させるのが望ましいかもしれない。しかし、細胞と細胞マトリックス成分との間の連合によって達成される機能の内の多く（例えば、細胞形状の画定、細胞極性及び体制化の達成、等）は、多分直接に発明のPCA物質への細胞結合によって達成されることになる。

発明の所定の実施態様において使用するために好適なその他の生物学的に活性な薬剤は、栄養源、脈管形成因子、リンパ網又は神経繊維の内殖を増進する又は可能にする化合物、等を含む。免疫調節因子、特に炎症の抑制剤を、移植された組成物への宿主応答を抑制するのが望ましい場合に、入れてよい。薬物もまた入れてもよい。

インビボ播種アプローチは、いくつかの状況で採用されるとはいえ、細胞は、本発明のPCA物質中にインビトロで導入するのが普通である（下記を参照）。細胞を水和されたプリカーサーペースト又はパテと混合した後に硬化させてもよく、又は代わりに、PCA物質組成物中に、それが硬化した後に導入してもよい。いずれの場合でも、細胞生育可能性を確実にするために、適当な成長（又は貯蔵）媒体を供するのが重要である。組成物をインビトロ播種した後にインビボで使用するために移植するつもりならば、生育可能性を移植処置全体を通して、及び移植処置後短い時間の間確実にするために、十分な成長媒体を供給しなければならない。一旦組成物を移植したら、PCA物質の多孔性は、細胞の栄養要求を宿主の循環する液によって満足させることができる。

本発明者等は、ダルベッコの最小必須媒体が本発明の実施において特に有用であることを見出した。用いることができるその他の溶液は、食塩加リン酸緩衝液

；カーボネート、HEPES、又はTRIS緩衝溶液を含むが、これらに限定しない。血清、成長因子、アミノ酸栄養源、糖、や塩のような更なる成長刺激成分を本発明において用いる水溶液に加えてよい場合がいくつかある。しかし、添加剤は、発明のPCA物質の硬化プロセスを変更し得るので、添加剤を回避するのが通常望ましい。添加剤の特定の収集を用いるのに選定したが、PCA物質特性に対してネガティブ作用を有したならば、精確なPCA配合物を、それが添加剤の存在において硬化パラメーターを満足させる能力について変更してテストすることができる。

細胞をPCA物質中に導入するのに、任意の利用可能な方法を採用してよい。多くの場合において、硬化する前に、細胞を水和されたプリカーサー中に導入するのが望ましくなる。例えば、細胞を水和されたプリカーサー中に注入してもよく（特に成長媒体と組み合わせて）、或は圧力、真空又は浸透のようなその他の手段によって導入してもよい。代わりに（又は加えて）、細胞を水和されたプリカーサー上に層にしても、或は水和されたプリカーサーを細胞懸濁液中に浸漬して細胞が物質に含浸又は結合する程の条件下でかつ時間の間そこに残留させてもよい。通常、含浸手順の間細胞死を最少にするために、細胞の過度の手動操作を回避するのが望ましい。例えば、ほとんどの状況では、細胞をPCA物質ペーストと手動で混合又は混練することは望ましくないであろう；しかし、そのようなアプローチは、十分な数の細胞が手順の後も生きることになるそれらの場合において完全に有用である。細胞は、また、水和されたプリカーサー中にインビボで、単に物質を所望する細胞の源に隣接する体に入れることによって導入してもよい。そのようなインビボ細胞含浸を、適当な送化因子、連合因子（すなわち、細胞が結合する因子）、又は細胞の所望する細胞タイプへの分化を誘発する因子を物質内に入れることによって増進させるのが望ましくなり得る場合がいくつかある。

細胞は、硬化されたプリカーサー中に導入するよりもむしろ、発明のPCA物質中に、それが硬化した後に導入してもよい。物質は多孔性であることから、細胞は、物質中に容易に移動することができる。細胞は、硬化されたPCA物質中に任意の利用可能な手段によって導入してよい。例えば、細胞を物質上に層にし

ても、或は圧力、真空又は浸透によって導入してもよい。代わりに（又は加えて）、硬化された物質を細胞懸濁液に入れて細胞が物質に含浸する程の条件下でかつ時間の間そこに維持させてもよい。その上に、硬化されたPCA物質は、金型により又は浸出可能な物質（例えば、糖、塩結晶、又は酵素分解性充填剤）との複合材として調製してデバイス内に播種用室又は領域をもたらしてもよい。そのようなアプローチでは、細胞をこれらの室中にピペット又は注射器によって導入するのが好ましい。細胞は、また、発明の硬化されたPCA物質中にインビボで、物質を水和されたプリカーサーについて上記した通りの望ましい細胞又は細胞プリカーサーの源に隣接する体に入れることによって導入してもよい。好適な実施態様では、硬化された物質を骨膜又は軟骨膜に隣接して入れ、又は望ましい細胞を含有する血液、液、又は損傷された宿主組織に暴露する。

当業者ならば容易に認める通りに、発明の物質（それが水和されたプリカーサーであろうと又は硬化されたPCA物質であろうと）中に導入するつもり細胞の数は、播種された物質の意図する用途及び用いる細胞のタイプに基づいて変わることになる。分裂する自己細胞を水和されたプリカーサー中に注入することによって導入している場合に、 1 cm^3 当たり細胞20,000~1,000,000を使用すると、物質内で細胞増殖及び細胞外マトリックス形成を生じると予期される。非分裂細胞を採用する場合には、一層多い数の細胞を必要とするのが普通である。播種をインビボでの物質中への宿主細胞移動によって行うそれらの場合では、物質を、細胞（例えば、骨形成用細胞）を含有する液に、又は組織（例えば、骨）自体に暴露すると、物質に細胞を特定数の細胞を接種することを必要としないで播種するのに有効であることが分かった。

送達動力学の改変

本発明のPCA物質の一つの利点は、この物質の再吸収の速度を、製造方法における改変によって調節することができることである。特に、一層密な硬化した生成物は、一般に、純粋な発明のPCAリン酸カルシウムのイン・ビボでの一層遅い再吸収時間を生じる。この点において、この硬化した生成物の密度又は再吸収動力学を変化させる様々な方法がある。これらには、ペーストを作るのに用いる液体の体積の調節、出発物質の粒度の変更、及び硬化中のペーストの圧縮が含

まれる。浸出可能な又は生物分解性の粒子又は物質がペーストに取り込まれた複合材料(及び最終的に硬化されたPCA物質)も又、製造することができる。これらの浸出可能な又は生物分解性の物質は、その後、高度に多孔性の移植物が生成するように硬化した物質からイン・ビポで除去され得る(例えば、浸出により)。更に、この発明のPCA物質は、同一の移植物中に密度の分布を有するように製造することができる。これが達成され得る一つの方法は、一の密度のイン・ビポで硬化したPCA物質を調製し、この硬化した物質を所望の粒度に粉碎し、次いで、この粉碎した物質を異なる密度のPCA物質を生成するようにデザインした第2のPCA物質ペーストと混合することによる。この方法で作製したPCA物質は、非同時に再吸収されよう。

PCA物質前駆体粉末を製造するための全体的に一層小さい粒度の物質の利用は、イン・ビポで再吸収し及び／又は再骨化するための一層長い時間を生じる(実施例5及び19を参照されたい)。ACP前駆物質は、一般に、非常に小さい粒度で調製されるので、2種類の成分を用いてこの発明のビヒクルを生成する場合には、一般に、他の非ACP成分の粒度を再吸収時間を調節するために利用する。この点において、粒度を、粉碎してふるい分けした第2の成分を用いることにより調節して、最終混合物への添加のための特異的な粒度分布を選択することができる。他の具体例においては、第2の成分をACPと共に粉碎して、再吸収速度に影響を及ぼす時間の量を変える。

PCA物質に、「侵食速度調節剤」(これは、その存在が全体としてデバイスの再吸収性の速度を変化させる物質である)を取り込むことにより、変化した再吸収性動力学を有する複合材料が生成される。薬物送達デバイスの再吸収速度を増大させる侵食速度調節剤には、このデバイスのイン・ビポでの経時的溶解度に影響を及ぼす(例えば、多孔度を変えることによる)任意の浸出可能な又は生物分解性化合物が含まれる。薬物送達デバイスの再吸収速度を減少させる侵食速度調節剤には、結晶性リン酸カルシウム特にヒドロキシアパタイト及び二リン酸化合物が含まれる。

この発明のPCA物質の再吸収速度を調節することのできる他の方法は、破骨細胞及び／又はマクロファージ細胞の作用による。破骨細胞(及び多分マクロフ

ア

ージ)は、自然に骨を消化する。本発明により、破骨細胞又はマクロファージ細胞、又はそれらの発生及び／又は活性を調節する因子を発明のPCA物質移植体と共に投与して、PCA物質の再吸収速度を加速し又は遅延させることができる。

例えば、破骨細胞の活性又は発生を直接又は間接に(例えば、骨芽細胞により)刺激する任意の剤を用いて、PCA物質移植体の再吸収速度を増大させることができる。逆に、破骨細胞の活性又は発生を直接又は間接に阻害する任意の剤を用いて、移植体の再吸収速度を減ずることができる。かかる刺激剤又は阻害剤は、当分野で周知である(例えば、Athanasou, J. Bone Joint Surg., 78-A:1096, 1996及びRoodman Endocrine Rev. 17:308, 1996を参照されたい。これらの各々を参考として本明細書中に援用する)。例えば、インターロイキン1 (IL-1)、コロニー刺激因子(CSF)例えばマクロファージ(M)-CSF、トランスフォーミング成長因子 α (TGF α)、腫瘍壊死因子(TNF)、インターロイキン6 (IL-6)、インターロイキン11 (IL-11)、インターロイキン3 (IL-3)、上皮小体ホルモン(PTH)、ビタミンD3代謝物(例えば、カルシトリオール)、プロスタグランジン(ある種の公知の条件下)、及び酸素遊離基が、破骨細胞の発生及び／又は活性を刺激することが知られている。SCFが有用である場合には、その後の1, 25-ジヒドロキシビタミンD₃の投与は、更に、破骨細胞を刺激することができる。対比してみると付随するコロニー刺激因子及び1, 25-ジヒドロキシビタミンD₃の投与は、破骨細胞を阻害する。

破骨細胞の発生及び／又は活性を阻害する他の因子には、トランスフォーミング成長因子 β (TGF β)、 γ -インターフェロン、インターロイキン4 (IL-4)、一酸化窒素、抗体(例えば、破骨細胞ビトロネクチンレセプターに対する抗体)、カルシトニン及びプロスタグランジン(ある公知の条件下)が含まれる。

勿論、再吸収を刺激するために、破骨細胞自体(又は、破骨細胞前駆細胞、好ましくは、それらの破骨細胞への分化を刺激する剤を伴う)をPCA物質移植体中に導入することも可能である。

P C A物質の再吸収速度を変える剤は、全身投与することも局所投与することもできる。局所投与は、好ましくは、その薬剤をP C A物質自身に導入するか会合させることにより達成する(好ましくは、ここに記載の手順による)。局所投与

を用いる場合には、薬剤のP C A物質移植物からの拡散が最小化されることが好ましい。例えば、比較的不溶性の薬剤は、移植物から拡散して身体内の他の細胞に望ましくない影響を与えることは一層ありそうにないので好ましい。

応用

上でほめかしたように、本発明の細胞播種したP C A物質は、通常、様々なイン・ビボ及びイン・ビトロ系の何れにおいても用いることができる。例えば、この物質を用いて、生物学的に活性な薬剤又は細胞を身体(獣医学への応用もこの発明の範囲内にあるが、好ましくは、ヒトの身体)内の様々な部位の何れへでも送達することができる。別法として又は追加として、この物質は、骨組織、修復応用又は塑性増強療法においてイン・ビボで用いることができる。この物質は又、細胞カプセル封入用の膜若しくはマトリックスとして、又は人工臓器の構築若しくは修復においても用いることができる。

イン・ビトロでは、この物質を、3次元細胞培養マトリックスとして、及び破骨細胞、骨芽細胞、軟骨細胞及び／又はマクロファージ培養、前駆細胞の分化及び／又は再骨化及びリン酸カルシウムの再吸収を分析するためのモデルとして用いることができる。この物質は、例えば、前駆細胞、幹細胞、骨細胞、破骨細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、マクロファージ、筋原細胞及び繊維芽細胞等の細胞を用いる組織形成及び／又は分解の研究特に有用である。この物質は又、生物学的に活性な薬剤のイン・ビトロでの送達を達成するために用いることもできる。

ある好適な応用を、下記において一層詳細に検討するが、これは、説明を目的とすることのみを意図しており、限定することを意図するものではない。

イン・ビボ又はイン・ビトロ送達用ビヒクルとして用いる場合には、本発明のP C A物質は、制御され、局在化された送達の利点を提供する。周知のように、生物学的に活性な薬剤は、全身投与されるよりも特異的部位に送達されるならば一層少量しか必要とされない。その上、薬剤の潜在的に有毒な副作用は、その薬

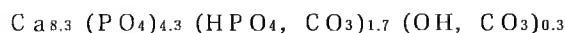
剤を本発明の送達用ビヒクルから送達する場合には、最小化される。又、薬剤活性も、その部位に送達されるまで送達用ビヒクル中に保護されているので、最大化される。

本発明のPCA物質は、任意の許容し得る組織中に注射し又は移植することができる。経口投与用配合物も又、この発明の範囲内にあると考えられる。好適な送達部位には、骨、筋肉、脊髄、中枢神経系、腹膜腔、皮下並びに目の硝子液及び水様液中の部位が含まれる。PCA物質を移植物の移動が懸念される状況下にある部位へ送達する場合には、係留用の糸又はフックをビヒクルに取り込ませてそれがその場所に付着されて維持されるようにすることができる。適宜、PCA物質を、骨質部位中への挿入により係留することができる(下記参照)。特別の応用及び好適な送達部位を、以下で一層詳細に検討する：

生物学的に活性な薬剤の骨質部位への送達

本発明のPCA物質は、生物学的に活性な薬剤の骨内の部位への送達に特に有利である。本発明のPCA物質から形成された送達用ビヒクルの骨質部位への移植は、送達用ビヒクルを係留するため及び薬物の全身への送達を達成するために別法として又は追加として利用することができ、又は厳密に骨の「内部」ではないがその隣接部位への送達を達成するために利用することができる。図9は、本発明のPCA物質の骨質部位における多くの有用な応用を描いている。

天然の骨物質は、ナノメートルサイズの、不十分に結晶化したアパタイト構造を有するリン酸カルシウムよりなる。しかしながら、理想的に化学量論的な結晶性ヒドロキシアパタイト、 1.67 のCa/P原子比を有する $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ と異なり、骨物質の組成は、有意に異なっており、下記式により表され得る、



骨の無機質の非化学量論は、主として、2価イオン例えば CO_3^{2-} 及び HPO_4^{2-} (これらは、 PO_4^{3-} イオンの代用にされる)のためである。 CO_3^{2-} 及び HPO_4^{2-} イオンの代用は、Ca/P比の変化を生じ、年齢及び骨質部位に依って、 $1.50 \sim 1.70$ で変化し得るCa/P比を生じる。一般に、Ca/P比は、骨

の加齢中に増大し、これは、炭酸塩種の量が典型的には老化した骨について増加することを示唆している。骨の無機質の特異的な溶解特性を生じるのは、ナノ結晶サイズ及び不十分に結晶性の性質に関連したCa/P比である。そして、骨組織

は、無機質再吸収細胞(破骨細胞)と無機質産生細胞(骨芽細胞)により調節される一定の組織修復を受けるので、無機質の溶解挙動は、これらの細胞活性の間の微妙な代謝バランスの維持において重要である。

本発明のPCA物質は、ナノサイズの、不十分に結晶性の、天然の無機質に匹敵するCa/P比を有する固体である。この物質は、生体再吸収性であり、低温で生成することができ、二次成形可能であり且つ注射可能である。これらの理由のすべてにより、この発明の物質は、骨質部位における薬物送達に特によく適合している。その上、この合成のPCA物質は、それが結局患者自身の骨により置換されるように骨の成長を支持することができる。しかしながら、骨の内植が本発明の薬物送達用物質の再吸収速度に十分影響を及ぼし得るということを心に留めておくべきである。従って、ある状況(例えば、生物学的に活性な薬剤を正確な予め決めた投与スケジュールに従って送達しなければならない場合)においては、例えば、骨細胞若しくは軟骨細胞又は前駆細胞の透過をブロックすることにより、薬物送達ビヒクル中への骨の成長を減じることが望ましいであろう。殆どの状況においては、骨化は、デバイスを骨から幾らか離して置くことにより回避することができる。一般に、1mmは、それより離れたほうが好ましくても十分であろう。インドハリネズミ遺伝子及び遺伝子産物、上皮小体ホルモン関連蛋白質(PTHRP)及びPTHRPレセプターアゴニスト等の化合物も又、骨の成長を阻害する薬物送達デバイス中に含まれ得るし、該デバイス上又はそれに隣接し得る。

他の状況においては、かかる骨の内植は、望ましく、助長することができる。

実施例14、17及び18に示すように、PCAリン酸カルシウム物質は、身体部位内に配置することができ、見かけ上新しい骨での完全な(100%)置換を生じるような仕方で再吸収させることができる。最適の骨化が望まれる場合には

、デバイス及び物体に骨形成細胞を播種することができる(下記参照)。このゴールは、デバイスを患者自身の骨形成細胞の源と接触させて配置することにより最も容易に達成される。かかる細胞は、骨組織中又は骨に伴う血液又は体液(骨又は骨物質又は領域(骨膜、海綿状骨又は骨髄を含む)と接触した外因性の液体を含む)中に見出され得る。ねじ又はピン等のデバイスの場合には、それらの骨への導入は、出液により達成され、更なる播種は必要でない。皮層骨にのみ対峙するプレ

ートについては、デバイスと接触するであろう骨膜損傷の誘導が推奨される。更に別の具体例においては、移植部位の皮層骨の一部を取り出すことにより骨の中に外科的に座席を用意することが有用であろう。骨化を増強する他のステップを取ることもできる(患者から採取した骨形成細胞の移植片への導入、又は栄養因子又は骨成長誘導蛋白質のデバイス中又はデバイス上への導入を含む)。非自家骨細胞も又、宿主の骨形成細胞の拒絶の前に所望の量の骨の再生が起きるならば、この発明の範囲内にある。この点において、免疫抑制剤を、幾つかの場合にはデバイス中に取り込ませることにより、デバイスレシピエントに投与することができる。従って、一次起源、細胞株又は細胞バンクから得られた細胞又は組織は、すべて、ある具体例において有用であり得る。

生物学的に活性な薬剤のある範疇は、骨質部位への送達に特に適していることが期待される。例えば、薬物送達ビヒクルをダメージを受けた骨の部位に適用する場合に、骨再生蛋白質(BRP)をそのビヒクルに取り込ませることは望ましいであろう。BRPは、骨の成長速度を増大させ、骨の治癒を加速することが示されている(例えば、Appel等, Exp.Opin.Ther.Patents 4:1461, 1994を参照された)。典型的なBRPには、トランスフォーミング成長因子ベータ(TGF- β)、細胞接着因子(CAF)、内皮成長因子(EGF)、OP-1及び骨形態形成蛋白質(BMP)が含まれるが、これらに限られない。かかるBRPは、現在、マサチューセッツ州、CambridgeのGenetics Institute；カリフォルニア州、Palo AltoのGenentech；及びマサチューセッツ州、HopkintonのCreative Biomoleculesにより開発中である。骨再生蛋白質及び栄養因子は又、所望であれば、異所性の骨

の形成を刺激するために用いることもできる。BMP-7を含むこの発明のPCA物質を、皮下に配置することができ、骨の形成が、1～2ヶ月以内に起きるであろう。

抗生物質及び殺菌剤も又、望ましくは、本発明のPCA薬物送達ビヒクルを用いて骨質部位へ送達される。例えば、骨の移植片の外科手術から生じる主な臨床的掛かり合いの一つは、手術後の炎症又は感染症特に骨髓炎の感染を制御する必要がある。本発明の1つの具体的な抗生物質を含む薬物送達デバイスは、改良された骨移植片として(又は該移植片と共に)用いて、手術部位での局所的感染の機

会を減じ、感染のない、従って、一層早い骨の治療プロセスに貢献することができた。抗生物質の効力は、この不十分に結晶性のヒドロキシアパタイトの再吸収を、それが抗生物質ペプチド又はその活性成分を最も効果的な投薬量で組織修復部位に送達する速度で溶解するように制御することにより更に増大される。

典型的な抗生物質には、ペニシリン、テトラサイクリン、カナマイシン、ゲンタマイシン、クロルテトラサイクリンヒドロクロリド(オーレオマイシン)、ミノシリン、ドキシサイクリン、バノマイシン、バシトラシン、ネオマイシン、エリスロマイシン、ストレプトミアン、セファロスポリン、クロラムフェニコール、オキシテトラサイクリン(テラマイシン)及びこれらの誘導体が含まれるが、これらに限られない。抗生物質及び骨再生蛋白質を、一緒に、本発明のPCA物質に取り込んで、骨組織修復の最適条件を促進するために必要な成分の殆ど又はすべてを局所的に送達することができる。

骨質部位に送達するのが望ましい他の生物学的に活性な薬剤には、抗癌剤例えば骨の腫瘍の治療のための抗癌剤が含まれる(例えば、Otsuka等, J.Pharm.Sci.84:733, 1995参照)。本発明の薬物送達ビヒクルは、例えば、外科的に除去された骨の腫瘍を有していた場合に特に有用である(何故なら、本発明の合成のPCA物質は、骨の部位の機械的完全性を改善することができ、同時に如何なる残留癌細胞をも治療して転移を回避することもできるからである)。典型的な抗癌剤には、例えば、メトトレキセート、シスプラチン、プレドニゾン、ヒドロキシprogesteron、メドロキシprogesteronアセテート、メゲストロールアセテート

、ジェチルスチルベストロール、テストステロンプロピオネート、フルオキシメステロン、ビンブラスチン、ピンクリスチン、ビンデシン、ダウノルビシン、ドクソルビシン、ヒドロキシウレア、プロカルバジン、アミノグルテチミド、メクロレタミン、シクロホスファミド、メルファラン、ウラシルマスタード、クロラムブシル、ブスルファン、カルムスチン、ロムスリン、デカルバジン(D T I C :ジメチルトリアゼノミダゾールカルボキサミド)、フルオロウラシル、5-フルオロウラシル、シタラビン、シトシンアラビノキンド、メルカプトプリン、6-メルカプトプリン、チオグアニンが含まれる。

本発明の骨質部位への送達のための合成P C A薬物送達システムに望ましく取

り込まれ得る更なる生物学的に活性な薬剤は、骨粗鬆症を軽減させる薬剤である。例えば、アミド化サケカルシトニン、骨粗鬆症に効果的であることが示されている。

ビタミンD及びビタミンKも又、望ましく、骨質部位に送達され、これらは、血管新生を増大させることが望ましい場合に用いることのできる脈管形成因子(例えば、v e g f)である。

骨の産生及び治療

本発明の好適具体例においては、P C A物質に骨形成細胞又はその前駆細胞を播種する。好ましくは、P C A物質を配合し、細胞集団を選択して、P C A物質が約4～12週以内に骨化されるようにする。

この発明の特に好適な具体例においては、播種を、P C A物質を宿主自身の骨産生細胞の起源と接触するように配置することにより達成する。かかる細胞は、骨組織中に又は骨に伴う血液又は体液(骨(海面状の骨を含む)と接触した外因性の液体、骨物質又は骨領域例えば骨膜又は骨髓を含む)中に見出される。

この発明のP C A物質を骨質部位に導入する様々な方法は、「Orthopedic and Dental Ceramic Implants」と題する米国出願に綿密に記載されており、これと同日に出願されている。P C A物質が、出血を誘導する方法でイン・ビボで骨質部位に移植される場合には、かかる出血は、効果的に骨形成細胞をこの物質中に導入することができ、更なる播種は必要とされない。出血を誘導するアプローチ

には、P C A物質をねじ又はピンに成形するか、又は他の物質から作製したねじ又はピンと共に適用するものが含まれる。

P C A物質を、皮層骨にのみ対峙するプレートとして又は該プレートと共に用いる場合には、骨膜損傷をP C A物質とその損傷との間の接触を創るように導入するのが好ましく、それにより、細胞は、その損傷からのP C A物質に浸透することができる。同様に、この発明の幾つかの具体例においては、移植部位の皮質骨の一部を取り出すことによりP C A物質の座席を骨の中に外科的に用意することが有用であろう。移植部位の細胞は、P C A物質中に移動して播種されるであろう。

勿論、P C A物質デバイスが宿主自身の細胞の移動によりイン・ビボで播種されることは、必要とされない。宿主から採取した骨形成細胞を、イン・ビトロでデバイスに導入して、播種された組成物を宿主に移植することができる。その上、非自家骨細胞の播種も又、この発明の範囲内にある(但し、宿主の骨形成細胞の拒絶の前に所望量の骨の成長が起きることを確実にするように注意しなければならない)。かかる非自家細胞は、様々な起源(一次起源、細胞株及び細胞バンクを含むが、これらに限定しない)の何れからでも得ることができる。

P C A物質内の又はその周囲の骨形成は、栄養因子及び／又は骨成長誘導因子のP C A物質デバイス中への又は該デバイス上への取込みにより促進することができる。

骨の増強

本発明の播種したP C A組成物は、骨質構造(例えば、あご先)の形状の増大又は変更に有用である。かかる適用のためには、P C A物質を、予備硬化した形状又は成形したパテ形態にて供給し、そして骨表面に適用することができる。一般に、増強適用のために選択されるP C A物質配合物は、比較的一層遅いタイムコースで再吸収が起きる(典型的には、再吸収に6～12週を要する)ものである。

増強適用に用いられるP C A物質は、幾つかの好適具体例は宿主細胞播種を含むが、典型的には、適用を通して、P C A物質に対する細胞又は細胞株を播種される。この用語「宿主細胞播種」は、宿主の細胞をP C A物質中に導入する任意

の方法を包含する。例えば、この用語は、宿主細胞の移植されたデバイス中へのイン・ビボでの移動、並びに骨血液又は骨膜のフラグメントをデバイス上に置き又はデバイスと接触させること(イン・ビボ又はイン・ビトロ)により達成される補助された移動を包含する(他のものの内で)。

軟骨の産生及び治癒

軟骨に対するダメージは、重大な物理的変形を生じ得る。現在、軟骨の喪失に対する最も一般的な治療は、補綴材料での置換であるが、このアプローチは、多くの困難と出くわしてきた。この分野の指導者の一人により述べられたように、

「真に生体適合性の機能的補綴の欠如は、火傷や怪我のために鼻や耳を失った個人に深く痛ましい影響を有し得る」。本発明の播種したPCA組成物は、PCA物質が二次成形可能な足場(その中へ又はその中で組織が成長できる)として作用する魅力的な代替品を提供する。このPCA物質は、生体再吸収性であり、それ故、結局、このPCA物質移植物は、天然の組織により置換され得；それ故、長期の補綴移植物の負の影響を回避することができる。

本発明のPCA物質は、軟骨形成を最適化するために軟骨形成細胞を播種することができる。好ましくは、この播種を、デバイスを宿主自身の軟骨形成細胞(例えば、軟骨細胞)又はその前駆細胞の起源と接触させて配置することにより達成する。かかる細胞は、軟骨に伴う血液又は体液(軟骨又は軟骨性物質と接触した外因性の液体を含む)中に見出される。従って、軟骨膜、軟骨又は骨髄と接触したことがある液体は、典型的に、かかる細胞を含んでいる。

多くの場合(例えば、ダメージを受けた耳の増強のためにデザインされたPCA物質)において、播種は、PCAデバイスを軟骨膜の裂けた領域に接触させて配置することにより達成することができる。他の場合においては、移植部位の軟骨の一部を取り出すことにより存在する軟骨性組織内にPCAデバイスのための座席を外科的に用意することが有用であろう。

本発明の幾つかの具体例において、この播種したPCA物質と関係した軟骨形成を増強する追加のステップを行うことができる。例えば、移植後にイン・ビボでデバイスに浸透する細胞に加えて(或は、別法として)患者から採取した軟骨形

成細胞をデバイス中に導入することができる。別法として又は追加として、栄養因子又は軟骨成長誘導因子をデバイス中に又はデバイス上に取り込ませることができる。

自家細胞が軟骨形成適用において用いられる播種したPCA組成物に必要とされないことは、明らかであるべきであり；非自家細胞も又、宿主の軟骨形成細胞の拒絶の前に所望量の軟骨の再生が起きるように細胞を選択し、PCA物質を配合する限り、この発明の範囲内にある。従って、一次起源、細胞株又は細胞バンクから得られる細胞又は組織は、本発明のこの具体例の実施において有用である。

異所性の骨又は軟骨の産生

本発明の播種したPCA物質組成物を用いて、骨又は軟骨が通常生じない部位に骨又は軟骨の形成を生じさせることができる。骨又は軟骨産生細胞を播種したPCA組成物のイン・ビボの移植部位への導入は、その部位における骨又は軟骨の形成を生じるであろう。好適具体例において、このPCA物質は、播種された細胞に加えて、成長因子及び／又は栄養因子を含み、それにより、異所的に形成された骨又は軟骨の維持が延長され得る。一度生じた場合には、かかる異所的組織は、その意図する用途に依って、その場に残すか又は外科的に取り出すことができる。別法として又は追加として、移植物にとって外的物である栄養因子又は成長因子を、例えばカプセル封入した細胞、ポリマー移植物の利用により、又は他の因子送達方法により与えることができる(例えば、Aebischer等の米国特許第4,892,538号；Seftonの米国特許第4,353,888号及びWinn等, Experimental Neurology 140:126(1996)を参照されたい)。

異所性組織は、発明の播種したPCA物質組成物を用いてイン・ビトロで形成することができる。好ましくは、水和した前駆物質を調製し、手で又は型の利用により形作り、その後、高めた温度(27～50℃)で硬化させる。別法として、PCA物質を、先ず硬化し、その後、機械加工し又は所望の形状に成形することができる。細胞播種は、異所性組織がイン・ビトロで所望の形状に形成されるように、ここに記載の任意の方法により達成することができる。一般に、この形状

が細胞成長中維持されることを確実にするためには、当分野で公知のように、分解性酵素又は細胞の作用を阻害するのが望ましいであろう。

細胞封入マトリクス

本発明のPCA物質は、細胞封入環境内での利用のための優れた成長マトリクスを提供する。この物質の利用は、細胞定着を阻害し、細胞分散を与え、そして封入した細胞による栄養局在化を最適にすることができる。従って、この発明により、細胞を本発明の水和した前駆物質又は硬化したPCAの存在下で封入用デバイス内に封入することができ、その結果生成した封入デバイスを、次いで、封

入細胞療法応用における使用のためにイン・ビボに移植することができる。細胞封入デバイスを製造し及び利用するのに有用な技術は、例えば、Winn等, Expt.Neuro1.140:126,1996及びAebischerの米国特許第4,892,538号; Seftonの米国特許第4,353,888号、及びKordower等, Cell Transplantation, 14:155, 1995に記載されている(これらの各々を参考として本明細書中に援用する)。

研究応用

本発明のPCA物質は、その製造容易さ、穏やかな形成条件、最も水性の系における乏しい溶解度及び細胞埋め込み応用における利用のための細工のし易さのために、研究及び組織培養応用における利用のための魅力的な3次元成長マトリクスを提供する。その上、この物質は、組織形成及び／又は退化(例えば、骨又は軟骨)の研究に有用である。好ましくは、かかる研究において用いる物質は、細胞例えば前駆細胞、幹細胞、骨細胞、破骨細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、マクロファージ、筋芽細胞及び繊維芽細胞を播種されている(但し、これらに限定されない)。

診断薬

本発明の細胞播種したPCA物質は、様々な健康又は病気の状態を検出する診断薬において用いることができる。例えば、この発明のPCA物質を定性的又は定量的アッセイで用いて、診断されるべき患者から採取した細胞の潜在的な骨又は軟骨を形成する能力を測定することができる。この発明の物質は又、血管新生

及び硬組織退化をアッセイするための診断薬においても用いることができる。様々な軟組織の診断も又、この発明のPCA物質組成物を用いて可能となる。

生物学的に活性な薬剤の皮下移植部位への送達：

本発明の薬物送達デバイスの応用は、勿論、骨質部位に限られない。非骨質部位においては、この物質は、骨化を伴わない再吸収が知られている。

本願の送達デバイスを皮下に置くことは、生物学的に活性な化合物のもとと全

ゲン及び／又はプロゲステロンの投与は、皮下適用の例である。更に、抗原及び／又はワクチンの投与は、皮下移植により達成することができる。

生物学的に活性な薬剤の中樞神経系への送達：

治療物質の中樞神経系への送達を、この発明の送達ビヒクルを用いて達成することができる。有用な治療用物質には、 γ -アミノ酪酸のてんかん病巣への送達、パーキンソン病の治療のためのドーパミン又はドーパミンの線条又は黒質への送達、パーキンソン病の治療のための側脳室、線条又は黒質における神経退行の阻止のための成長因子例えばGDNFの送達、アルツハイマー病の治療のためのNGFの皮質その他の領域への投与、又は無骨髄側部(amyelolateral)硬化症の治療のためのCNTFの仙骨又は腰部脊髄への投与が含まれる。

その他：生物学的に活性な薬剤の各部位への送達

他の潜在的な送達部位には、筋肉内、腹腔内及び眼の領域が含まれる。

実施例

実施例1：反応性非晶質リン酸カルシウムの製造

この実施例は、比較的不活性な非晶質のリン酸カルシウム固体のステッパーステップ製造法及び該リン酸カルシウム固体を本発明の高度に反応性の非晶質リン酸カルシウムにする方法を記載している。

溶液Aを、55gの $\text{NaHPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (リン酸ナトリウム)、50gの NaOH (水酸化ナトリウム)、30gの NaHCO_3 (重炭酸ナトリウム)及び2gの $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ の、1.31の蒸留水中への急速溶解により室温で調製した。溶液Bを、43gの $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (硝酸カルシウム四水和物)及び1gの $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ の0.51の蒸留水中への急速溶解により室温で調

製した。

不活性な炭酸ガス飽和の非晶質リン酸カルシウムを、次いで、室温で、溶液Bの急速攪拌中の溶液Aへの急速添加により調製した。こうして形成されたゲル様の非晶質リン酸カルシウムの沈殿を、濾紙(0.05sq.m)及び約 10^{-2} トル

の真空圧力を用いて、中位のフィルター速度で直ちに濾過した。この物質は、薄いケーキを形成し、それを、濾過用漏斗中に水を加えることにより約4リットルの蒸留水で洗浄した。この洗った物質を、次いで、スパーテルを用いて集め、2.5Lコンテナ中の液体窒素に浸した。硬い凍結片の形成後に、このコンテナを、24時間、細かい乾燥した粉末が得られるまで、真空チャンバー($10^{-1} \sim 10^{-2}$ トル)中に移した。

上記の手順は、室温で実施できるが、全プロセスは、更に、非晶質状態が一層安定な結晶形態に転換するのを阻止するために、好ましくは、周囲温度より低温(4~5℃)で催される。更に、かかる結晶質ヒドロキシアパタイト形成の阻害剤として作用することが知られている元素又はイオンを、極微量で、この溶液に加えることができる。

このプロセスのこの点における不活性非晶質物質の赤外スペクトルは、P-O基(600 及び 1000 cm^{-1})、 CO_3^{2-} 基($1,420 \sim 1,450\text{ cm}^{-1}$)に特徴的なピークを含み、比較的大きいO-H基のピーク($\sim 3,550\text{ cm}^{-1}$)を伴う。同じ物質のX線回折パターンは、コヒーレントピークのバックグラウンドに対する比を取るにより結晶化度を測定したときに如何なる鋭いピークも存在しないことにより示されるように、この物質の非晶質の性質を示している。

上記の不活性な非晶質物質を、次いで、60分間 $450^\circ\text{C} (\pm 3^\circ\text{C})$ に加熱することにより反応性形態にした。この加熱した物質のIR(示さない)は、特定のP-O基及び CO_3^{2-} 基の減少を示し、 H_2O 及び CO_3^{2-} の CO_2 及び H_2O としての有意の減少を示している。同様にして調製した試料において、炭素含量が約60%落ちたことが認められ、全炭酸塩比が $1.56 \sim 0.5\%$ 減少していた。しかしながら、この物質の非晶質の性質は、図4(a)に示したX線回折パターンにより示されるように、このプロセス中失われなかったことに注意されたい。加

熱処理後のこの物質のCa/P比の測定値は、定量的電子マイクロプローブ分析を用いて、1.575であると測定された(図2)。透過型電子顕微鏡下で見られる非晶質物質の全体的な形態的及び超微細構造的特性を、図1に示す。鋭い縁のない「非晶質の」外観は、この無定形形態を示す物質のある部分を有する各顆粒を分離することに注意されたい(矢印)。120 m²/gの極度に高い比表面積が、約1

30 Åの平均細孔寸法と共に、この物質において観察された。

実施例2：反応性非晶質リン酸カルシウムの製造

溶液A及びBの調製を下記の反応で置き換えたこと以外は、実施例1に記載したようにして製造を行った。溶液Aを、90.68 gのCa(NO₃)₂・4H₂Oの1.2リットルの炭酸ガス飽和した蒸留したH₂O中への急速溶解により、室温で調製した。溶液Bを、40.57 gのK₂HPO₄を1.53リットルの蒸留したH₂O(24 mlの45 vol. %溶液を含む)中に溶解させることにより調製した。この手順により生成した生成物の非晶質リン酸カルシウムの化学的及び物理的特性は、実施例1に従って製造した物質の特性に類似していた。

実施例3：反応性非晶質リン酸カルシウムの製造

溶液A及びBの調製を下記の反応で置き換えたこと以外は、実施例1に記載したようにして製造を行った。溶液Aを、10.58 gのCa(NO₃)₂・6H₂Oの0.15リットルの炭酸ガス飽和した蒸留したH₂O中への急速溶解により、室温で、9.0より大きいpH(NaOHにより調整)にて調製した。溶液Bを、7.8 gの(NH₄)₂HPO₄を0.35リットルの蒸留したH₂O中に溶解させることにより調製した。この手順により生成した生成物の非晶質リン酸カルシウムの化学的及び物理的特性は、実施例1及び2に従って製造した物質の特性に類似していた。

実施例4：反応性の非晶質リン酸カルシウムからの、合成の不十分に結晶性のアパタイト物質の製造

この実施例は、この発明のPCA物質の製造を記載する。

この実施例で用いるリン酸二カルシウム二水和物(DCPD)を、下記の方法で

調製した。溶液Aを、10 gの $\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_4\text{P}$ (リン酸水素ニアンモニウム)の500 mlの蒸留水(pH 4.6~4.8)中への急速溶解により室温で調製した。

溶液Bを、17.1 gの $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (硝酸カルシウム四水和物)の250 mlの蒸留水中への急速溶解により室温で調製した。リン酸二カルシウム二

水和物を、溶液Bの攪拌中の溶液Aへの急速添加により室温で調製した。その後直ちに、この試料を、中位のフィルター速度で、濾紙(0.05 sq. m)及び約 10^{-2} トルの真空圧力を用いて濾過した。この物質は、ケーキを形成し、それを約2リットルの蒸留水で洗い、次いで、室温で、24~72時間風乾した。

実施例1で製造した反応性の非晶質リン酸カルシウム物質を、乳鉢及び乳棒を用いて、3~5分間、リン酸二カルシウム二水和物($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)と50:50wt%にて物理的にドライブレンドした。次いで、水(ブレンドした物質1 g当たり1 ml)をこの粉末混合物に加えてペースト状のコンシステンシーとした。添加する H_2O の量は、濃いペーストを所望するか薄いペーストを所望するかによって変化した。このペースト物質を、次いで、湿らせたティシューパーで包み、37℃に加熱することにより固体のマスに固めた。この固化工程は、試料をパラフィルムに包んで4℃に保持することにより数時間遅延させることができた。固化は又、セットアップ時間が延びるであろうが、周囲温度で進行させることができる。

固化した物質は、合成のヒドロキシアパタイト物質について報告された溶解度を超える固有の溶解特性を有するナノメートルサイズの結晶性の乏しいアパタイトリン酸カルシウムよりなっていた。これは、図3に示されており、そこでは、制御されたpH緩衝溶液中に37℃で24時間にわたって放出されるカルシウムイオンの濃度が、標準結晶性ヒドロキシアパタイト物質(曲線52)よりも、本発明のPCA物質(曲線50)について有意に高かった。

実施例5：合成の不十分に結晶性の物質の、選択した粒子サイズの前駆物質からの製造

この実施例は、選択した粒子サイズを有する前駆物質を用いる、合成のPCA

物質の製造を示す。

DCPDを、実施例4に記載のように調製した。この乾燥物質を、SPEX8505アルミナセラミック粉碎用チャンバーを備えたSPEX8510ラボラトリーミルで5分間粉碎した。粉碎後に、その物質を、順次、Tylerテストシーブシエーカーによってふるいにかけて、表1に示したように8つの異なる粒度分布の

DCPDを生成した。

表1 DCPD粒度分布

試料	粒度分布	37℃30分における 固化の程度
10-1	<25 μ m	固い
10-2	25~35 μ m	固い
10-3	35~53 μ m	固い
10-4	53~63 μ m	固い
10-5	分布B3	固い
10-6	106~125 μ m	十分に固化していない
10-7	分布B2	十分に固化していない
10-8	ふるい分けしていない 分布B1	十分に固化していない

ふるい分け前のDCPDの予備粉碎は、実質的に結果を変えずに、乳鉢及び乳棒を用いる簡易な手作業の粉碎により置き換え得ることが見出されている。

実施例1、2又は3から調製した反応性非晶質リン酸カルシウム物質を、DCPDと1:1(wt/wt)で、10分間、SPEX8505アルミナセラミック粉碎チャンバーを備えたSPEX8510ラボラトリーミルを用いて物理的にドライブレンドした。次いで、水(ドライブレンド1mg当たり1.0~0.8ml)をこの粉末混合物に加えてペースト状コンシステンシーとした。表1に示した8の試料中の5が、37℃30分にてよく固化した。試料6、7及び8は、他

の試料程に急速又は堅固には固化しなかった。これらの試料の各々は、他の試料よりも有意に高い $>100\mu\text{m}$ の粒子のパーセンテージを有した。これらの観察から、一層小さい粒度のDCPDの使用が、一層大きい粒度のDCPD中で一層急速且つ完全な固化へ導くということが結論され得る。

実施例6：合成のPCA物質の、反応性非晶質リン酸カルシウムからの製造

実施例1で製造した反応性非晶質リン酸カルシウム物質を、実施例4で記載した方法に従って、他のリン酸カルシウム化合物とドライブレンドした。これらの化合物には、制限はしないが、 $\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$ (メタリン酸カルシウム)、 $\text{Ca}_7(\text{P}_5\text{O}_{16})_2$ (十リン酸七カルシウム)、 $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ (ピロリン酸カルシウム)、 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (リン酸三カルシウム)が包含される。この乾燥混合比を、反応性非晶質カルシウムと混合した化合物のモルCa/P比に依って、1.5~1.70のCa/P比であるように適当に計算した。その結果生成した物質は、実施例3に示したのと同じ溶解度特性を有する不十分に結晶性のアパタイトリン酸カルシウム固体であった。

実施例7：合成のPCA物質の、反応性非晶質リン酸カルシウムからの形成のための注射可能なペーストの製造

この実施例は、不十分に結晶性のアパタイトリン酸カルシウム固体の形成のための注射可能なペーストの製造を記載する。

実施例4~6に従って製造した乾燥混合物質を、蒸留した H_2O (2.3ml/mg)と混合した。手で容易に形づくることができ又は0.5mm ID程の小さいノズルを通して注射可能なペーストが形成された。その流動性は、このペーストを2~3時間4℃に冷却した後に増大した。

この物質は、ペースト形態にて、固化することなく、気密容器内で、4℃で約12時間にわたって貯蔵することができた。

実施例8：合成の不十分に結晶性のアパタイトリン酸カルシウム物質の特性。

PCA物質の結晶含有量を、X線回折及びI-R分光測定により測定した。

図5a~dは、実施例4に記載したDCPDと反応性非晶質リン酸カルシウムとの間の反応生成物のX線回折スペクトルである。この反応混合物を、37℃の

湿った環境に置き、X線回折分光測定により種々の時間にて試験した。X線スキャン条件は、(a)銅製陽極、(b) $\lambda = 1.4540598 \text{ \AA}$ 及び(c) 0.02° のステップでのスキャンレンジ $20 \sim 35^\circ$ 及び2秒のステップ間隔。図6は、リン酸二カルシウム二水和物(a)、この発明の活性化ACP(b)、及び本発明の

PCA物質(c)の赤外スペクトルを示している。

図5a～dの試料を、それぞれ、0、20分、75分及び5時間にわたってインキュベートした。これらの試料を、記した時間に取り出し、凍結乾燥して化学的特徴を保存した。図5a(反応開始時に測定)は、開始時のACP及び二リン酸二カルシウムに帰すことのできるピークの組合せを表している(成分のXRDパターンについて図4参照)。結晶性二リン酸二カルシウムについての $ca. 20.25^\circ$ 、 23.5° 、 29.5° 、 30.75° 及び 34.2° における鋭いピークが、容易に観察される。反応時間の増加と共に、鋭い結晶性のピークは落ち込み、広い(非晶質)ピークが、 26° 、 28.5° 、 32.0° 及び 33.0° に集中して現れている。75分間の反応後に有意のスペクトルの変化がないということに注目することは、この変換反応が本質的に1時間少々で完結したことを示しており、興味深いことである。この発明のPCA物質のX線回折パターン(図5d)は、図7に示した天然の骨のそれに匹敵し得る。これらの2つのスペクトルは、ほぼ同じであり、これは、この発明のアパタイトリン酸カルシウムの密接な生体模倣性を示している。

実施例9-12：合成のPCA物質の反応性非晶質リン酸カルシウムからの形成のための注射可能なペーストの特性

これらの実施例は、合成の不十分に結晶性のヒドロキシアパタイト物質の形成に用いるべき注射可能なペーストのコンシステンシー及び反応性に対する液体容積の効果を示す。これらのペーストの各々を実施例7に記載のように製造し、室温及び 37°C におけるコンシステンシー及び反応速度を測定した。観察を、表2に報告する。

水の容積を変えて製造した1グラムの薬物PCA物質の

二次成形適性、注射可能性及び反応性

実施例の番号	水の容積 (mL)	二次成形適性	注射可能性	固化時間(分) (4℃/RT/ 37℃)
9	0.7	— 微片	—	— / — / —
10	0.8*	+++ 容易に形成さ れたペースト	+	>60/ >60/ 30
11	0.9*	++ 練り歯磨き	++	>60/ >60/ 30
12	1.0	+ 液体練り歯磨	+++	>60/ >60/ 30

*幾つかの情况(例えば、蒸発)において、これらの試料は、室温で1時間にわたって幾分か乾燥させることができる。このような場合、追加の水を加えて元のコンシステンシーを回復させることができる。

実施例13：前駆物質及び生成物質の赤外スペクトル

この実施例は、これらの実施例により生成された結晶性及び非晶質の前駆物質及び類似の前駆物質の反応により生成された最終的なPCA物質の赤外スペクトルを比較する。図7aは、実施例4に記載のようにして調製したブラッシュ(DCPD)のIRスペクトルを表し；図7bは、実施例1に記載のように調製した熱処理後のACPのスペクトルを表し；そして図7cは、実施例4に記載のように調製したPCA物質のIRスペクトルである。

実施例14：骨質部位におけるPCA物質の移植及び再吸収

この研究の目的は、骨質移植部位におけるPCAリン酸カルシウムの再吸収及び骨化をアッセイすることである。この方法は又、この発明のPCAリン酸カルシウム配合物及び組成物の再吸収及び骨化特性を試験するのに有用である。

試験物品は、実施例4に記載のように調製したPCAリン酸カルシウム配合物であった。ACP及びDCPDを特定の割合で混合し、SPExグラインダー装置にて1分、30秒粉碎した。

成体(>5月齢)のNZW雄ウサギを、研究の開始前に少なくとも10日間にわたって隔離して順化させた。動物を、個体ごとに、吊り下げたステンレス鋼製ケージに収容した。木の削りくずをケージの下に糞皿にて用いた。研究の開始前に、動物をグループ又は処置群にランダムに割り当て、耳に番号を入れ墨することにより及び対応ケージカードにより識別した。すべての動物は、一の脛骨中に単一の欠損を有した。評価の時点は、2、4及び8週であった(各時点にて動物2匹)。外科手術を、完全麻酔下で且つ無菌外科手術条件下で行った。

十分な麻酔を得た後に(例えば、麻酔効果を奏するためのケタミン/キシラジン)、無菌技術を用いて、外側近位脛骨上に切り込みを入れた。軟組織を一方にそらせて骨を露出させた。低速の歯科用ハンドピースにて約5mmの穿孔器を、必要なだけの灌注(0.9%生理食塩水)と共に用いて、～5.5mmの直径の穴を骨の表層部を通して開けた。この骨質ディスクを皮膚を含まないように切り分け、その部位を移植用に準備した。ペースト状の水和した前駆物質をこの欠損中に配置した。対照用動物の欠損は、未処理のままであった。次いで、軟組織を重ねて閉じた。動物一匹当たり一の試料を、この方法を用いて調製した。

これらの動物の一般的健康及び安寧の並びにそれらの歩行能力に対する特別の注意を伴う臨床的観察を少なくとも毎週行なった。すべての動物は、良好な健康状態に見えた。研究の終わりに、これらの動物を過量の麻酔により安楽死させて、移植部位を集めた。これらの脛骨の放射線写真を予定した間隔(手術後及び検死時を含む)で作成した。

これらの移植部位をホルマリンで固定し、ヘマトキシリン及びエオシンの何れか、マッソン三色染色法、又は石灰質を除いた試料からのフォン・コッサ染色ス

ライドで染色した。石灰質除去してない組織学的試料も又、調製して、黄緑色の塩基性フクシンで染色した。研究室での動物の病理学の経験のある免許のある獣医の病理学者の委員(ACVP)が、スライドを顕微鏡観察により評価した。骨の

形態学についての主観的な観察を行い、組織化された骨の存否及び検出可能なP C Aリン酸カルシウム物質の存否を書き留めた。

組織学的結果は、2週目において幾らかの無機質化を示した。4～6週までに、移植を受けた動物は、P C Aリン酸カルシウムを残している形跡を伴わずに、移植部位に正常な小柱骨を有した。未処理の対照は、十分な内植及び／又は非皮質型の骨を有さず、十分に治癒しなかった。図10 a及びbは、それぞれ、外科手術の2週間後の未処理の及び処理した脛骨欠損の顕微鏡写真である。見られるように、未処理試料の欠損の縁の右側の骨は、薄い小柱骨であり（図9 a）；処理した試料の欠損の縁の右側の新たな骨は、厚い小柱骨である。

実施例15：皮下部位におけるP C A物質の移植及び再吸収

この実施例は、ラットの皮下に移植したときの、この発明のP C Aリン酸カルシウムの再吸収を示す。それは又、バイオセラミック移植材料及び複合材料の新しい配合の再吸収特性を試験するのに有用なスクリーニング手順をも示す。

80匹の雄の及び80匹の雌のSprague-Dawleyラットに、各々、4ml (2～4 g)のこの発明のP C A (実施例4で製造)を背側の皮下に移植した(k g当たりで考えたヒトでの最大量の10倍より多い)。対照用動物を、等容積の生理食塩水で処理した。操作手順は、実施例16に記載してある。これらのラットを、表3に与えたスケジュールに従って犠牲にし；移植部位を、実施例16に記載したように調べた。

表3 犠牲にするスケジュール

犠牲にする時点	P C Aリン酸カルシウム移植体
1 週目	5 m / 5 f
2 週目	5 m / 5 f
1 月目	5 m / 5 f
3 月目	5 m / 5 f
1 年目	20 m / 20 f

臨床病理学分析用の血液を、これらの動物をC O₂麻酔して、後眼窩血脈洞又

は心臓穿刺により集めた(全部同じ方法による)。血液試料を各動物のグループから予定された犠牲に供する前に集めた。これらの動物の一般的健康及び安寧についての臨床的観察を、3ヶ月間は少なくとも毎週、その後は毎月行った。

1週目において、PCA物質は、移植部位に存在し、おそらく再吸収プロセスと関連する中位の乃至顕著な肉芽腫を伴って見出された。2週目において、少量のPCA物質が、依然として、移植部位に存在し、随伴する肉芽腫は、軽度乃至中程度であった。4週目までに、殆どの組織は、移植部位に僅かに残った肉芽腫を有する正常のものに見えた。12週目において、移植の形跡は残っていなかった。

実施例16：筋肉内部位におけるPCA物質の移植及び再吸収

この実施例は、変化させた粉碎時間の結果としての変化したイン・ビボでの再吸収時間を有するPCA物質の移植物の製造を記載する。個々の乾燥前駆物質、ACP及びDCPDを実施例4に記載のようにして製造した。次いで、DCPD及びACPの幾つかの異なる配合物を、i) DCPDをSPEXグラインダーにて15秒、30秒、1分、2.5分又は5分間にわたって粉碎し；ii) 粉碎したDCPDを1：1でACPと合わせ；そしてiii) この混合物を、それぞれ、更に15秒、30秒、1分、2.5分又は5分間粉碎することにより製造した。それ故、これらの異なる標品の総粉碎時間は、30秒、1分、2分、5分及び10分

間であった。

約2.5Mradのガンマー線照射により滅菌した粉末形態のPCAリン酸カルシウムを、粉末形態のこの物質を取って滅菌水又は滅菌生理食塩水と混合し、それを2mmの厚みの約1cmのディスクに成形することにより実施例4に記載のように製造し、少なくとも30分間にわたって37℃でインキュベートした。ディスクを、製造後直ちに、成体の雄のニュージーランドホワイトラビットに移植した。

動物を、3匹の雄を含む投与グループに割り当てた(総数は、15匹)。これらの移植物をこれらのウサギにランダムに割り当てた。外科手術の10～15分前

に、動物にキシラジン(10 mg/kg, i. m.)を前投薬した。次いで、その動物にケタミン(50 mg/kg, i. m.)を与えた。その動物の背面を刈り込んで毛をなくし、ベタディン外科用溶液とアルコールで洗った。外科手術前に、この動物が適当に麻酔されていることを確認するために監視した。これを行うために、圧力を足蹠に加えた。応答がない場合には、その動物は、適当に麻酔された。この手順の間中、その動物を、ひげのひきつり及び足指をつねることへの反射について監視した(これは、この動物が起きていないことを示した)。

無菌技術及び円刃刀を用いて、腰部最長筋(*m. longissimus lumborum*) (背骨の両側に沿って位置している)上の皮膚に1~2 cm長の切開を作った。この切開を作るときに、下にある筋膜及び筋肉も切断して、試料を筋肉中に入れることを可能にした。試料ディスクを直接この筋肉中に配置して、移植物全体が確実に筋肉中に埋まるようにした。この筋肉を、一本の吸収可能な縫合糸を用いて閉じ、皮膚を一針ずつの縫合により皮下で閉じた。金属製の皮膚用ステープルを用いて、外側の皮膚表面の切り口を閉じた。5つの試料を、この方法にて、各側に配置した。各試料を切開の末端に配置し、それらは、互いに約1 cm離れていた(図解参照)。これらの試料は、7 mm×2 mmのディスクの形態で重さ約150 mgであった。これらの動物を監視し、起床時にブプレノルフィン(0.02~0.05 mg/kg, s. q.)を与えた。手術後3日間にわたって、鎮痛薬を1日2回投与した。

これらの動物を、手術後直ちに、及びその後2週間毎に放射線写真を撮った。

これらの放射線写真を、これらの物質の再吸収を追跡するために比較した。時点間の如何なる変動をも最小にするために放射線写真のための標準化法を用いた。

安楽死後、移植部位を、先ず肉眼での検査により評価した。可視的な移植物を伴う部位において、これらの移植物は、灰色乃至黄色の固体のディスクに見えた。移植物が再吸収された部位では、筋肉の赤色乃至黄褐色の変色領域が観察された。

移植物を含む筋肉組織を、それらの移植物を乱さないよう注意しながら取り出した。これらの組織及び識別マークを、10%の中性の緩衝されたホルマリンを

満たした標識したジャーに入れた。すべての移植部位を顕微鏡下で処理して評価した。観察には、病巣繊維症、病巣肉芽腫炎症及び移植物の外観が含まれた（幾つかの場合）。繊維症は、最初、繊維細胞及びコラーゲンとして見られた。肉眼的再吸収を伴う動物は、繊維症及び最小の乃至中程度の肉芽腫病巣炎症を有した。肉芽腫炎症は、病巣のマクロファージ及び巨細胞の凝集として見られ、ときには細胞質内結晶を伴い、時折異種親和性及びリンパ球を伴った。再吸収されなかった移植物の周囲の炎症は、第一に、軽度の繊維症及び／又は肉芽腫炎症に対して最小であり、これらの両者は、筋肉内移植物について許容範囲内である。

4週目において、30秒、1分又は2分間にわたって粉碎することにより製造したPCAリン酸カルシウム移植物から作成したペレットは、完全に再吸収された。5分又は10分間にわたって粉碎することにより製造したものは、完全には再吸収されなかった。

実施例17：骨質部位におけるPCA物質の移植及び再吸収

この研究の目的は、骨質部位におけるこの発明のPCAリン酸カルシウムのし吸収及び骨化をアッセイすることであった。

成熟(>1年齢)ビーグル犬を、それらの大きさ及び骨研究用のモデルとしての歴史的な利用の故に採用した。このイヌの脛骨は、大きい(>5mm)欠損を創り、動物の歩き回る能力を傷つけることなく骨における欠損の誘導に対する二次的な骨折を誘導することなく研究することを可能にするだけ十分に大きい。

10匹の成体の雄及び雌のビーグル犬(6.0～15.0kg)が同じ処置を受

け；欠損を、各脛骨の脛骨稜皮質の側面に創った(8mm又は10mm)。PCAリン酸カルシウムを、一方の脛骨中に配置し、他方の脛骨は、対照とされた。

切り込みを近位脛骨上に創った。軟組織を一方にそらせて骨を露出させた。低速の歯科用ハンドピースにて8mmの穿孔器を、必要なだけの灌注(0.9%生理食塩水)と共に用いて骨質ディスクを切り分けて遊離させ、その部位を移植用に準備した。この発明のリン酸カルシウム物質(固体又はペースト)を、この欠損中に配置した。次いで、軟組織を重ねて閉じた。動物一匹当たり1～3の試料をこの方法を用いて行った。これらの動物を、予定期間にわたって治療させた。

動物を、0、2、4及び8週目に、臨床的観察、放射線写真及び欠損部位の顕微鏡検査により評価した。特に、脛骨の放射線写真を、研究中、2週間毎に撮った。これらの放射線写真を、研究の継続期間の決定に用いた。隔週の終わり頃に、2匹の動物を犠牲にして、試験部位を組織学用に取り出した。これらの移植部位を石灰質除去してない及び石灰質除去した切片として調製した。

2匹のイヌをパイロット動物として用い、それらは、PCA物質を受けなかった。これらのパイロット動物において、幾らかの治癒が、2週目において放射線写真により認められた。6～8週までに、欠損は、完全に治癒した。イヌの欠損の大きさを1cmにおいて最適であるとして測定した。残りの8匹のイヌにおいて、対照用の欠損は、6週間以内に治癒し；処置した欠損は、2～4週間で治癒した。これらの対照用欠損における骨の質は、薄い小柱骨であり；処置した欠損においては、骨は、厚い小柱骨乃至皮層型の骨であった。従って、処置した欠損は、処置しなかった欠損より約2週間早く治癒し、且つより良い骨の厚みで治癒した。

図11は、この発明のPCA物質で処理した欠損部位中へのイヌの小柱骨の、手術後8週間での成長の高度に拡大した(10×)写真を示している。小さい矢印は、骨片を裏打ちする骨芽様細胞を示しており、増大された細胞活性を示している。

図12は、この発明のPCA物質で処理したイヌの皮層骨欠損の顕微鏡写真を示している。大きい矢印は、欠損の縁を示している。この新たな骨の成長は、欠損の右側にあり；手術後4週間で、この成長は、厚い小柱骨である。

実施例18：骨質部位におけるPCA物質の移植物の移植及び再吸収

この研究の目的は、この発明のPCAリン酸カルシウムの再吸収及び骨化をアッセイすること及び試験PCAリン酸カルシウム物質をスクリーニングするためのパラメーターを確立することであった。

18匹の成体(>3月齢)NZW雄ウサギをこれらの研究において用いた。十分な麻酔を得た後に(例えば、麻酔効果を奏するケタミン/キシラジン)、無菌技術を用いて、近位脛骨上に切り込みを創った。軟組織を一方にそらせて骨を露出さ

せた。低速の歯科用ハンドピースにて約5mmの穿孔器を、必要なだけの灌注(0.9%生理食塩水)と共に用いて骨質ディスクを切り分けて遊離させ、その部位を移植用に準備した。この発明のPCAリン酸カルシウム物質(固体、顆粒又はペースト)を、欠損中に配置した。次いで、軟組織を重ねて閉じた。

動物の一般的健康及び安寧の臨床的観察(特に歩行に関する観察)を、毎週行い、一層詳しくは、週2回の放射性写真の時点に行った。これらの脛骨の放射性写真を、予定した間隔で作成した(手術後及び検死の時を含む)。

移植部位を、ヘマトキシリン及びエオシン、マッソン三色染色法石灰質除去した試料として及び石灰質除去していないスライドとして調製した。

発見及び臨床的観察は、外科手術と関係しており、PCAリン酸カルシウム移植物とは関係しなかった。手術後の臨床的観察は、手術に関連した外傷に関して予想される発見の範囲内であった。手術後直ちに及び各々の予定の犠牲の時点において放射性写真を撮った。

手術の直後に、すべての骨の欠損部位は、明確であり；移植物は、骨と同じ放射性密度を有するように見えた。手術の2週間後に、対照用の欠損は、明確な部位を有し、移植部位は、一層明確でなく、周囲の骨の中へブレンドされており；類似の発見が4週目において観察された。7週目に、すべての部位は、増大した放射性密度と同様に見えた。肉眼的に、2週目の欠損部位は、対照の及び処理した動物においてははっきりと見る事ができた。4週以上経過すると、移植物又は対照部位は、肉眼的には確認できなかった。

放射性写真による発見は、対照用動物において7週目までに僅かな変化しか示さず；発明のPCA物質で処理した動物は、時間を超えて増大する放射性密度を欠損において有した。対照用動物における欠損は、4～7週以内に、主として薄い小柱型の幾らかの新しい骨の内植を有した。処理した動物における欠損は、2週目という早期に骨の内植を有し、7週目までに新しい骨で満たされた。顕微鏡による発見は、増大された骨のPCAリン酸カルシウム移植物との置換と一致している。合わせると、この研究は、対照用動物で7週目までに、この発明のPCA物質で処理した動物で4週目までに、ウサギの脛骨中の5mmの欠損が治癒し

又は新たな骨の成長を有したことを示している。又、このウサギの単一皮層の5 mmの決定的サイズの欠損のモデルは、試験物品を再吸収及び骨化特性について分析するのに有用である。

図13は、未処理(図13a)の及び処理した(13b)ウサギの脛骨の欠損の手術後4週目の顕微鏡写真を示している。大きい矢印は、欠損の縁を示している。図13aにおいて、小さい矢印100は、欠損部位における豊富な繊維性結合組織を示している。大きい矢印102は、この欠損における新しい小柱骨を示している。図13bにおいて、2つの小さい矢印104は、この欠損における厚い小柱骨の成長の境界線を画定している。

実施例19：粒子サイズを変えることによる合成PCA物質の再吸収速度の変化

PCA前駆物質を、実施例5に従って調製する。2つの前駆体混合物、試料6に対応する試料A及び試料1、2、3及び4の2：4：3：1混合物に対応する試料Bを調製する。水和したこれら2つの試料の前駆体ペーストを、ゲッ歯動物において、実施例15の皮下試験にて試験する。再吸収を、様々な時点において監視する。

実施例20：生物学的に活性な剤のPCA物質デバイスへの取込み及びイン・ビトロ安定性の保護

この実施例は、蛋白質の本発明の送達ビヒクル中へのその蛋白質のイン・ビトロ安定性を保存するような仕方での取込みを示す。

ウシ膵臓トリプシンを、リン酸緩衝塩溶液中で、100mg/mlの濃度で調製する。この溶液の0.8mlを、活性化ACPとDCPDの1：1混合物1g(実施例17、試料Bに記載)に加える。この混合物を大丸薬に成形して37℃で30分間湿った環境中で硬化させる。硬化した大丸薬を、次いで、一晚凍結乾燥し、続いて、それを乳鉢と乳棒を用いて粉碎する。この方法で形成した粉末を1mlの水と混合し、カゼインアッセイプレート中のウェルに塗布する。このウェルの周囲の環中の濁ったカゼインのクリアランスを、熱不活性化したトリプシンに続いて凍結乾燥したPCA試料を同様に加えたウェル中で認められたクリアランスと比較する。

実施例21：生物学的に活性な剤のPCA物質デバイスへの取込み及びイン・ビボ安定性の保護

この実施例は、蛋白質の本発明の送達ビヒクル中へのその蛋白質のイン・ビボ活性を保存するような仕方での取込みを示す。

200mg/mlのベータガラクトシダーゼ(Worthington LS004093)をリン酸緩衝塩溶液(pH7.0)中で調製する。この溶液の0.8mlを、活性化ACPとDCPDの1:1混合物1g(実施例17、試料Bに記載したように調製)に加え、パテに混合する。この二次成形可能なPCAを、次いで、大丸薬に調製し、ラットの皮下に移植する。2週間後に、このPCA大丸薬を取り出し、凍結乾燥して乳鉢と乳棒で粉碎する。この粉末を、次いで、例えばMiller(Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1972)に記載されたような液体アッセイを用いて、ベータガラクトシダーゼ活性についてアッセイする。

実施例22：抗生物質の送達

この実施例は、歯科用途において抗生物質を送達するための本発明の送達ビヒクルの利用を示す。

100mg/mlのゲンタマイシンを、リン酸緩衝塩溶液(pH7.0)中で調製した。この溶液の0.8mlを、活性化ACPとDCPDの1:1混合物1g(実施例17、試料Bに記載したように調製)に加え、パテに混合する。この二次

成形可能なPCAを、次いで、大丸薬に調製し、ラットの皮下に移植する。2週間後に、このPCA大丸薬を取り出し、凍結乾燥して乳鉢と乳棒で粉碎する。この粉末を、次いで、殺菌活性について、USP阻止試験の殺菌/細菌停止ゾーンを用いてアッセイする。

実施例23：ワクチンの送達

この実施例は、ワクチンを送達するための本発明の送達ビヒクルの利用を示す。

スカシ貝ヘモシアニンを、リン酸緩衝塩溶液(pH7.0)中で、0.5mg/mlの濃度で調製する。この溶液の0.8mlを、活性化ACPとDCPDの1

：1混合物1g(実施例17、試料Bに記載したように調製)に加え、パテに混合する。この二次成形可能なPCAを、次いで、大丸薬に調製し、ラットの皮下に移植する。この工程を、4ヶ月間、月ベースで繰り返す。血液試料を、標準ベースで採取し、抗スカシ貝ヘモシアニン抗体力価をELISAにより測定する。

実施例24：核酸の送達

この実施例は、細胞のトランスフェクションの目的のための核酸の筋肉内送達のための本発明の送達ビクルの利用を示す。この方法は又、DNAを筋肉以外の組織に取り込ませるために利用することもできる。

pUC19プラスミドDNAを、EDTA TRIS(pH7.4)にて、2mg/mlで調製する。この溶液の0.8mlを、活性化ACPとDCPDの1：1混合物1g(実施例17、試料Bに記載したように調製)に加え、パテに混合する。この二次成形可能なPCAを、次いで、大丸薬に調製し、ラットの筋肉中に移植する。4週間後に、移植部位の筋肉を切開して、Bガラクトシダーゼ遺伝子産物の存在について組織学的に染色する。

実施例25：パーキンソン病の治療のためのPCA物質デバイスの移植及び再吸収

この実施例は、パーキンソン病の治療のための薬物を送達するための本発明の送達ビクルの利用を示す。

霊長類を、MPTPを用いて半パーキンソン症候群患者にし、Kordower等、Cell Transplantation 14:155-171, 1995に記載されたように、行動を評価する。

200mg/mlのGDNFを、リン酸緩衝塩溶液(pH7.0)中で調製する。この溶液の0.8mlを、活性化ACPとDCPDの1：1混合物1g(実施例17、試料Bに記載したように調製)に加え、パテに混合する。水和したPCA前駆物質を、次いで、3つの円柱(各々、約1mm×1cm)に形作り、37℃で湿った環境中で硬化させる。

これらの円柱を、次いで、実験動物の傷害された側の側脳室に入れ、それらの霊長類の行動を、継続的に評価する。2ヶ月後に、これらの動物を犠牲にして、黒質及び線条のニューロンをチロシンヒドロキシラーゼ活性について分析する。

実施例26：予備硬化した移植物：イヌの下顎アンレーモデルにおける増大及び再吸収

この研究の目的は、イヌの下顎部位における、この発明のPCAリン酸カルシウムの2つの配合物の再吸収、骨化及び生体適合性を評価することであった。予備硬化したPCAリン酸カルシウムを、イヌの下顎アンレーモデル(これは、更に、増大モデルとして用いることができる)において、移植した。

この試験物品は、実施例16に記載したタイプ2及び10に対応する2種類の配合のPCAリン酸カルシウムであった。このPCAリン酸カルシウムを、移植前に約40℃で湿った環境中で予備硬化させた。対照用移植物は、それぞれ、シリコーンの及び多孔性ヒドロキシアパタイトの3mm×4mmの円柱であった。

2匹の成体の雌の獵犬タイプのイヌ(20～25kg)をこの研究において用いた。両方のイヌは、2つの対照用の移植物を下顎の右側に受け(各1つずつ)、タイプ2及びタイプ10のPCAリン酸カルシウム配合物の各一方を左側(反対側)に受けた。

移植を、完全麻酔下で且つ無菌的外科手術の条件下で行った。これらの動物にトランキライザー及びアトロピン型剤を前投薬して、バルビツール酸塩で誘導した。この動物の生命徴候(温度、心拍数、呼吸速度)を、この手順の前及び実施中

を通して監視した。これらの動物を、足指をつねること及び角膜刺激により適当な麻酔の深さについて試験した。適当な麻酔を得た後に、無菌技術を用いて、下顎と頸基部(下顎の下縁を超える)の中側(midlateral)腹側面上の皮膚を切開した。軟組織を一方へそらせて骨を露出させた。外側の下顎面上の骨膜を持ち上げて、骨面をバー又はドリルで、それが円柱状移植物を受け入れる形状で粗く出血するまででこぼこにした。この方法を用いて、各外側下顎面上に、動物当たり及び側面当たり2つの試料を置いた(2つの実験用のPCAリン酸カルシウム試料と2つの対照)。これらの試料を、それらが互いに近くに置かれることのないことを保証するために約1cmにて配置した。骨膜を、先ず、3-0ピクリルを用いて閉じた。次いで、軟組織を重ねて3-0ピクリル吸収可能な縫合糸で閉じた。皮膚を5-0ナイロンの単純結節縫合により閉じた。これらの動物を、予定期間

にわたって治癒させた。一方のイヌを3週目に、他方のイヌを3ヶ月目に犠牲にし、試験部位を組織学用に取り出した。すべての動物を安楽死させて識別マークを集めた。

移植部位を石灰質除去してない切片として調製した。切片を生体同化、生物分解及び生体適合性について評価した。

これらの結果は、次の通りであった：すべての時点において、優れた生体適合性が認められた。巨細胞は認められず、最小限のマクロファージが認められた。P C Aリン酸カルシウム移植物の底部に少数の細胞の厚みだけの最小限の反応層だけがあった。これは、対照の何れかについて認められたものより有意に優れている。

3週目において、タイプ2の物質の大部分は、再吸収された。12週目において、タイプ2は、元々の骨の表面に完全に再吸収された。更に、窩中の骨は、完全には分化しなかった。

タイプ10の試料は、新たな骨の内植及び移植物中への細胞移動を伴う骨の完成を示した。移植物自体は、12週間後には、約10%が再吸収されていた。

シリコンの対照用移植物は、再吸収可能でなく、軽度乃至中程度の外来抗体反応を示した。空隙は、3週目には埋まってなかったが、12週目までには繊維性の組織で満たされた。ヒドロキシアパタイトの対照用移植物は、最初の12週間

以内に再吸収又は骨の完成の如何なる徴候も示さなかった。

この実験は、この発明のP C Aリン酸カルシウムの優れた生体適合性を確認した。更に、2つのP C A配合物の間で再吸収時間に差が認められ、前駆物質が一層長時間にわたって混合／粉碎された試料(タイプB)についての再吸収のタイムコースが延長されていた。

これらの結果は又、急速に骨化する装入物を有する実施例14、17及び18の適用と比較して一層遅い再吸収及び骨化特性(装入物を有しない下顎移植部位で認められた)をも示す。

実施例27：異所性の骨の生成

この実施例は、発明の細胞播種したP C A物質を用いる、モデル動物における

異所性の骨の生成を記載する。

このPCA物質を、該物質を予備硬化させること、用いる水和媒質が0.8 ml/gのリン酸緩衝塩溶液(pH7.4)であること、及びこの物質に下記のように細胞を播種することを除いては、実施例15及び16に記載したように調製して、皮下又は筋肉中に移植する。幾つかの場合においては、0.2 mg/mlのBMP7が水和媒質中に含まれている。

移植前に、水和したPCAの1gの試料に、生検針を用いて予め採取した約50 μ lの患者の骨髓を注射器を用いて接種する。次いで、水和した前駆物質を移植する。週2回PCAを回収できるように十分な患者を利用して、異所性の骨の生成を研究する。

実施例28：自家細胞播種によるイン・ビボでの軟骨の生成

この実施例は、自家軟骨産生細胞を播種した発明のPCA物質組成物からの骨の表面での軟骨の生成を記載する。

イヌ及びウサギを含む多くの場合において、PCA物質で処理した骨を組織学的に調べたときに、予想外の軟骨の形成が認められた。図18は、NZWウサギからの放射状の骨の顕微鏡写真である(ヘマトキシリン及びエオシンで染色)。PCA物質の小丘を、偶然に、健康な骨の領域に適用したが、軟骨の形成が、PCAの小丘の中央にはっきりと認められる。天然の骨を2で示し、軟骨性の領域を1で示してある。

実施例29：イン・ビトロでの軟骨の生成

この実施例は、本発明の細胞播種したPCA物質組成物からのイン・ビトロでの軟骨の生成を記載する。

ヒトの軟骨細胞を用意し、軟骨生成をGoldring(Methods in Molecular Human Cell Culture Protocols, Jones編, Human Press. p.217-232, 1996、参考として本明細書中に援用する)に従って測定し；ラットの細胞株CFK2をBernier等(1993 J.Bone Miner.Res. 8:475, 1993)に従って維持し；そして椎間軟骨細胞をRivard等(Fifth World Biomaterials Congress, pg.291, 1996)に従って調製する。すべての手順を無菌条件下で無菌的に行う。

無菌のPCAの水和した前駆物質を、実施例5、試料5に従って調製する。水和媒質は、 $2 \times \text{HBSS}$ (50 mM HEPES 、 10 mM KCl 、 280 mM NaCl 及び 12 mM グルコース $\text{pH} 7.5$)である。この水和した前駆物質を、2つのスラブ(各々は、約 1 mm の厚みで約 1 cm^2 である)に成形する。第1のスラブに小さいくぼみを作り、 $10\% \text{ FCS}$ を含む約 $5 \mu\text{l}$ の成長培地中の約 $25,000$ 細胞を、このウェル中に配置する。第2のスラブを第1のスラブの上に置き、これら2つのスラブの縁を一緒に締め付ける。その結果生成した組成物を、それが $10\% \text{ FCS}$ を含む成長培地に水没するようにペトリ皿中に置く。このペトリ皿を 37°C の $5\% \text{ CO}_2$ インキュベーター中に置く。この培地を、3～4日毎に交換する。週ベースで軟骨の形成について試料を分析するのに十分な複製が調製される。

実施例30：異所性の軟骨形成

この実施例は、発明の細胞播種したPCA物質組成物を用いる、動物モデルにおける異所性の軟骨の生成を記載する。

このPCA物質を調製し、実施例15及び16に記載のようにウサギの皮下又は筋肉中に移植する(但し、この物質を予備硬化せず、用いる水和媒質は 0.8 m

$1/\text{g}$ のリン酸緩衝塩溶液($\text{pH} 7.4$)であり、そしてPCA物質には下記のよう

に細胞を播種する)。幾つかの場合には、 0.2 mg/ml の1型コラーゲンをこの水和媒質中に含有させる。

移植前に、水和したPCAの 1 g の試料に、約 $100 \mu\text{l}$ の酵素的に単離した自己の膝関節の軟骨細胞を接種する。好ましくは、これらの軟骨細胞を、PCA物質中に注射器を用いて送達する。この細胞播種された水和した前駆物質を移植する。週2回のPCAの回収を可能にするだけ十分な患者を用いて、異所性の軟骨生成を研究する。

実施例31：イン・ビボでの軟骨の修復

この実施例は、発明の細胞播種したPCA物質組成物を用いる、動物モデルにおける異所性の軟骨の生成を記載する。

P C A 物質水和前駆物質を調製し、外科的に軟骨を除去したイヌの膝関節に移植する。用いる水和媒質は、0.8 ml/g のリン酸緩衝塩溶液(pH 7.4)であり、水和した前駆物質に下記のように細胞を播種する。幾つかの場合には、0.2 mg/ml の I 型コラーゲンをこの水和媒質中に含有させる。

移植前に、水和した前駆物質の1 g の試料に、約200 μ l の酵素的に単離した自己の膝関節の軟骨細胞を接種する。これらの軟骨細胞は、好ましくは、注射器により送達する。この細胞播種された水和した前駆物質を移植する。週2回のP C A の回収を可能にするだけ十分な患者を用いて、関節の軟骨の生成を研究する。

実施例 3.2 : 細胞をカプセル封入したマトリクス

この実施例は、カプセル封入細胞治療のための発明のP C A マトリクスの利用を記載する。カプセル封入デバイスを、公知の方法に従って製造する(Aebischer等の米国特許第4,892,538号; Sefton等の米国特許第4,353,888号、Winn等Experimental Neurology 140:126(1996)、これらの各々を参考として本明細書中に援用する)。

デバイスに、15,000の繊維芽細胞の存在下で水和した前駆物質ペーストを詰め込んでシールする。デバイスは、イン・ビトロに維持するか又はレシピエント動物に移植する。デバイスを周期的に外植し、トリパンブルーで細胞の生存力をチェックする。

実施例 3.3 : P C A / H A 複合材料を用いるイン・ビボ増強

この実施例は、長期間持続し形状を保持する骨格増強を生じるためのP C A / H A 複合材料における比較的ゆっくり再吸収されるP C A 物質の利用を示す。

P C A / H A 複合材料は、微粒子のH A (粒度<200 μ m)を、実施例5、試料5に記載した発明の水和した前駆物質パテと、0.05~30% wt/vol に及ぶ比で混合することにより製造する。この混合により生成した粒状パテを、移植に適した形態に形作る。この粒状パテを、次いで、37℃で硬化させる。

この移植部位を、皮層の骨(骨膜を含む)数ミリメートルを切り分けることにより調製する。可能であれば、移植部位に骨膜を皮層の骨表面から剥がすが、付着

したままにしておく。この物質及び切り分けた骨からの血液を、保持し、そして新鮮なPCA物質ペースト(即ち、水和した前駆物質)と約1:3の体積比で混合し、取っておく。新鮮なPCA物質ペーストをセメントとして用いて、移植物を露出した皮層の骨面へ貼り付ける。必要ならば、更なるPCA物質ペーストを塗布して移植物の接着を確実にする。保持されたPCA/組織物質混合物を、次いで、移植物のための播種源として用いて可能な限り多くの移植物表面に塗布する。次いで、骨膜をできるだけ移植物上に引き戻す。

実施例34: ACP及び関係する促進剤を用いるPCAリン酸カルシウムの生成

この実施例は、硬化特性及び種々の関連する促進剤を用いるACPからのPCAリン酸カルシウム形成を示す。高度に反応性のACPを、実施例1に従って製造した。

試料1-1、1-2及び1-3の微結晶性ヒドロキシアパタイトを、次のように、結晶化の阻害剤を用いずに調製した: 218gのオルトリン酸水素二ナトリウム($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)を1200mLの蒸留水の溶液に溶解させた。試料1-1及び1-2の炭酸ガス飽和のPCAリン酸カルシウムについては、この

溶液に80gの NaHCO_3 も加えた。70gの硝酸カルシウム[$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$]を、500mLの蒸留水に溶解させた。このカルシウム溶液を急いで、室温で定速で攪拌しているリン酸塩溶液に注いだ。沈殿が直ちに起こりそして実質的に完結した。酸性リン酸カルシウムの形成を回避するために、その沈殿のpHを水酸化ナトリウム溶液の添加により7.4に調節した。この沈殿を、プフナーロート(総表面約0.1sq.m)を通す濾過により溶液から直ちに分離し、約3リットルの蒸留水で洗った。低結晶化度のリン酸カルシウムのゲルケーキが濾紙上で得られた。このゲルケーキの一部を、直ちに、試料1-2及び1-3について、凍結乾燥した。

試料1-1について、ゲルケーキを、次のように処理した: 濾過及び洗浄の後、適当量の蒸留水(5~80重量%)をこのゲル沈殿に加えた。次いで、それをポリテトラフルオロエチレン(PTFE)の型(直径60mm; 高さ2mm)にキャ

ストし、ゲル中に捕捉されている空気泡を放出させるために数分間(超)音波処理した。

これらの型を制御された温度(5～37℃)及び湿度(10～95%RH)のチャンバー中で乾燥させた。これらの試料は、乾燥に際してゆっくり収縮し、殆ど水を放出した。これらの試料の乾燥及び収縮の速度は、初期水分含量に依存した。この物質は、乾燥に際して硬化してガラス質になった。それは、約10%の残留水を含んでいた。

残りのヒドロキシアパタイト及びカルシウム源は、商業的供給元からのものをそのまま用いた。

表4 関連する促進剤を用いるACP変換

試料	関連する促進剤	37℃での インキュベーション	硬化の 程度	P C A * (FTIRによる)	P C A * (XRDによる)
1-1	炭酸ガス飽和の微結晶 性の風乾したヒドロキ シアパタイト	30分 2時間	凝固開始 固い	y e s	N D
1-2	炭酸ガス飽和の微結晶 性の凍結乾燥したヒド ロキシアパタイト	30分 2時間	固い 固い	y e s	y e s
1-3	炭酸ガス飽和してない 微結晶性の凍結乾燥し たヒドロキシアパタイ ト	30分 2時間	凝固開始 固い	y e s	N D
1-4	Aldrichヒドロキシア パタイト 粒度<15~30 μ m	30分	固い	y e s	y e s
1-5	Clarksonヒドロキシア パタイト 粒度>250 μ m	30分	凝固開始	y e s	N D
1-6	Monetite非焼成 粒度	30分 15時間	軟らかい 凝固開始	y e s	N D
1-7	C a C O ₃	30分 15時間	凝固開始	y e s	N D
1-8	C a (O H) ₂	30分 15時間	軟らかい 凝固開始	y e s そして C a (O H) ₂	N D
1-9	C a (C H ₃ C O O) ₂	30分 15時間	軟らかい 軟らかい	y e s	N D

* P C A = 不十分に結晶性のアパタイトリン酸カルシウム

N D = 分析していない

ACPは、特異的な促進剤と約50:50の比(wt/wt)で、SPEXラボラトリーミルにて5分間混合した(表1参照)。乾燥粉末1g当たり約0.8mLのH₂Oを、乾燥前駆物質混合物に加えて、混合してペーストとした。この混合物を、次いで、大丸薬に形作り、湿ったティシュペーパーに包んで37℃で少なくとも30分間固化させた。30分後、及びその後の様々な時点において、このペーストを固さについて監視した。図15及び16は、反応1-2及び1-4からの代表的XRDである。2つの異なる粒度のヒドロキシアパタイトの関連促進剤としての利用は、異なる粒度のDCPDを伴う類似の結果を生じた(実施例5参照)。即ち、粒度の大きいヒドロキシアパタイト程、もっと小さい粒度のヒドロキシアパタイトより一層ゆっくり且つ一層不完全に固化した。

実施例35：中性のアパタイトリン酸カルシウムプロモーターの利用

この実施例は、中性のアパタイトリン酸カルシウムの、骨の成長をイン・ビボで促進するためのこの発明のPCAリン酸カルシウムへのACPの変換のための促進剤としての利用を示す。化学量論的なヒドロキシアパタイトを、実施例34～37に記載のように、反応性ACPと混合する。水和した前駆物質ペーストを動物患者に実施例14、15又は16に記載したように塗布する。骨の治癒及び生体適合性を、記載したように、指示した時点で監視する。

実施例36：プロモーターを利用するPCA物質の製造

この実施例は、種々の受動的促進剤を用いるPCAリン酸カルシウムのACPからの製造を示す。

高度に反応性のACPを、実施例5に従って調製した。ACPを特異的な促進剤と約5:1又は1:1の重量比(表2参照)で5分間SPEXラボラトリーミルで混合した。水(0.75～0.85mL)を加えて混合してパテを形成した。この混合物を、次いで、大丸薬に形成し、湿ったティシュペーパーに包んで37℃に少なくとも30分間加熱した。30分後、及びその後の様々な時点で、このペーストを固さについて監視した。図17は、アルミナ促進剤を用いる試料2～4

からの代表的なXRDである。この図において、アルミナのピークは、標準PCAリン酸カルシウムプロファイル上に重ねて見ることができる。

表5

受動的促進剤を用いるACP変換

研究 #	受動的促進剤 (ACP : 促進剤)	インキュベーション 時間 (37℃)	硬化の 程度	PCA* (FTIRによる)	PCA* (XRDによる)
2-1	SiO ₂ (5 : 1)	30分 3時間	軟らかい 非常に固い	yes	yes
2-2	雲母 (5 : 1)	30分 12時間	軟らかい 非常に固い	yes	yes
2-3	Al ₂ O ₃ (1 : 1)	30分 12時間	軟らかい 非常に固い	yes	yes
2-4	Al ₂ O ₃ (5 : 1)	30分 12時間	軟らかい 非常に固い	yes	yes

* PCA = 不十分に結晶性のアパタイトリン酸カルシウム

実施例37 : 反応プロフィール

この実施例は、活性化ACP及びDCPD前駆物質を用いる好適具体例の反応の温度感受性及び正味の熱吸収性を監視するための走査示差熱量計(DSC)の利用を示す。

同重量のACPとDCPDを含む乾燥前駆物質混合物を、SPEX8505アルミナセラミック粉碎チャンバーを備えたSPEX850ラボラトリーミルにて実施例4に記載のACPとDCPD前駆物質を2分間混合することにより調製した。この水和した前駆物質の調製は、混合乾燥前駆物質1グラム当たり0.7～1.5mLの水を加えることにより達成した。約4℃に予備冷却した水(0.05mL)を47.27mgの乾燥前駆物質混合物に加えて、直ちに熱量計に入れた。このDSC(Perkin Elmer 7シリーズ熱分析システム)を、走査速度5℃/分で、開始温度0℃にセットした。結果は、図16に示してある。このプロットは、最初の7分間の反応性の監視を表しており、本質的に0.0℃と凡そ20℃との間

で熱の流れがないことを示している(この点において、吸熱性の熱の流れが起きる)。この熱の流れの特性は、37℃において、この反応は本質的に吸熱性であり、用いた条件下においては、反応は、約20℃より低温ではあったとしても非常にゆっくりと起きるだけであることを示している。従って、このシステムにおける正味の反応性、即ちこのシステムの吸熱性及び発熱性の熱の流れの総和は、吸熱性である。

実施例38：ある組成物における硬化の不在

この実施例は、促進剤の不在におけるACPのPCAリン酸カルシウムへの変換を記載し、新たに形成されたPCAリン酸カルシウムが固化できないことを示す。同様に、促進剤DCPDは、それ自身では、固化又は変換することができない。

DCPD及び様々なACP及び他のリン酸カルシウムを水と混合して、それらの37℃で固化する能力について試験した。表6には、これらの結果並びに試験期間後の反応生成物の同定をまとめてある。何れの状況下においても、固化は、最長で3日目まで認められた。ACPのPCAリン酸カルシウムへの変換が起こり得ても、促進剤の存在は、凝固及び固化を達成するために望ましいということが結論された。

表6

促進剤の不在におけるACP変換

ACP	H ₂ O (g)	インキュベーション	固化	FTIR	XRD
ACP(実施例5)	0.8	30分 12時間	軟らかい 軟らかい	ACP PCA*	ACP PCA*
DCPD(実施例8) 38.53 μm	0.7	30分 12時間	軟らかい 軟らかい	DCPD DCPD	ND
ACP(実施例7) 非熱活性化	1.5	30分 12時間	軟らかい 軟らかい	PCA* HA	ND
ACP(実施例5) 非炭酸ガス飽和	1.5	30分	軟らかい	ACP	ND
ACP(実施例6) 非熱活性化	1.5	30分	軟らかい	ACP	ND
ACP(実施例5) 非炭酸ガス飽和； 熱活性化	1.5	30分	軟らかい	PCA*	ND

* PCA=不十分に結晶性のアパタイトリン酸カルシウム

ND=分析していない

実施例39：種々の硬化剤の硬化及び最終製品に対する効果

水和した前駆物質(ACP及びDCPD)を実施例4、5又は37又は10に記載したように調製した(但し、様々な水和媒質を用いた)。次いで、試料を固さと反応の完全さについて様々な時点において試験した。すべての場合において、1gの混合した前駆物質を0.75～1.0mLの水和媒質を用いて水和してペーストを生成した。表7には、結果をまとめてあり、様々な水ベースの液体特に生理的に許容し得る液体をPCAリン酸カルシウムの製造に用いることができることを示している。

表7

硬化剤の効果

水和媒質	インキュベーション	硬化
トリス	30分	固い
0.9M NaCl	30分	固い
MEM	30分	固い
MOPS	30分	固い
HEPES	30分	固い
BUFFERALL	30分	固い
PBS	30分	固い

実施例40：硬化の分析

実施例5に従って製造したPCAリン酸カルシウムの硬化した試料の多孔度を測定した。

PCAリン酸カルシウムの硬化した試料(1g)を加湿インキュベーターから取り出してから直ちに重さを量り、次いで、室温で12時間にわたって乾燥させた。この乾燥させた試料を注意して重さを量り、次いで、体積を計算した。この試料を20mLの水の試料中に入れた。1分後、凡その置換体積を書き留めた。この乾燥試料は、H₂O中で、最大でその乾燥重量の50～60%まで吸収することが見出された。これらの結果は、この試料が最大で50～60%多孔質であることを意味すると解釈される。密度は、約1.65g/cm³であった。

実施例41：変換を促進する再吸収可能なポリマーの利用

この実施例は、ACPのPCAリン酸カルシウムへの変換を促進する再吸収可能なポリマーの利用を示す。

顆粒状のPLLAを調製し、100μmの大きさにふるい分けする。こうして得た粉末を実施例37のACPと混合し(5:1 ACP:PLLA)、5分間にわたってSPEXラボラトリミルで粉砕する。水を1gのこの混合物に加えて練ることのできるペーストを形成する。このペーストを大丸薬に形作り、湿った

環境中で37℃で1時間加熱する。この硬化した試料をFTIR及びXRDを用いて分析する。

実施例 4 2：周囲以下の温度での硬化の特性

この実施例は、周囲以下の温度での水和した前駆物質の硬化の特性を研究する。

水和した前駆物質を、実施例 3 7 に記載のように水を用いて調製し、次いで、しっかりとシールしてパラフィルム又はアルミニウム管における蒸発による損失を回避した。次いで、これらの試料を、最大で 1 時間、2 4 時間及び 6 日間保持した。これらの示した時点において、水和した試料を冷凍から取り出して 3 7℃ の湿った環境に置いた。すべての場合において、これらの試料は、3 0 分以内に固化した。

実施例 4 3：室温での硬化

この実施例は、取り出した水和した前駆物質を室温に維持することの効果を示す。

乾燥前駆物質を、C を除いて実施例 6 に記載のようにして調製した。この乾燥前駆物質を示した量の水と混合し、取り出して様々な時間室温に置いた後に硬化及び 1 6 ゲージの針を通しての注射可能性について試験した。その結果を表 8 に報告する。

表 8

室温に置いた後のペーストの注射可能性

試料の重量(g)	加えた水(mL)	混合時間(分)	持続時間(分)	室温(℃)	16ゲージ針での注射可能性	硬化；(30分/37℃)
1	0.8	20	10	25	非常に良好	非常に良好
1	0.8	20	20	24	非常に良好	非常に良好
1	0.8	20	30	25	非常に良好	非常に良好
1	0.8	20	40	25	良好	非常に良好
1	0.8	20	50	24	不十分	非常に良好
5	4.2	40	10	24	非常に良好	非常に良好
5	4.2	40	20	25	非常に良好	非常に良好
5	4.2	40	30	25	良好	非常に良好
5	4.2	40	40	25	不十分	非常に良好

これらの結果は、1グラムの試料が周囲の条件で注射可能なペーストとして最長で45分間安定であり得ること及び、5グラムの試料が周囲の条件(空气中、25℃)で注射可能なペーストとして最長で30分間安定であり得ることを示している。

実施例44：液圧プレスを用いる圧縮前駆物質

この実施例は、液圧プレスを用いるペレットの製造方法を説明する。

Carverラボラトリプレスを用いる。特異的量の粉末を重量により測定する。この粉末を、次いで、ダイセット型に入れる。高さ又は厚みを、部分的に、型中で用いる物質の量によって決定する。一度物質をダイ中にセットしたならば、この型を液圧プレス上に置く。所望の重荷をこのプレス上にセットする。次いで、この物質を特異的な時間にわたって圧縮する。この時間の経過後に、生じたペレットをダイセットから収容コンテナ中へ排出する。

ロットAB971002からの0.5gの試料(ID=ABcoml)を、Carverラボラトリプレスにて、500psi(ponds per square inch)で5分間圧縮した。この生成したペレットの物理的面は、直径=1.3mm、高さ=3mmであり、そして密度は、1.27g/cm³であった。機械的強度は、固く且つ手

で破壊できると記載された。FTIR分析後、このペレットは、湿ったティシュー中の70%PCA、20ml蒸留水中の90%PCA、及び炭酸ガス飽和の緩衝溶液(CO₃-2 0.2モル)中の100%PCAであった。ロットAB971002からの第2の0.5gの試料(ID=ABcom2)を、Carverラボラトリープレスにて、4700psiで5分間圧縮した。このペレットは、次の結果を有した：直径=13mm、高さ=2mmであり、そして密度は、1.99g/cm³である。その機械的強度は、非常に固く且つ手で破壊できると記載された。このペレットを、37℃で60時間インキュベートしてFTIR分析により分析したとき、下記の結果が見出された：湿ったティシュー中の60%PCA、20mlの蒸留水中の60%PCA、及び炭酸ガス飽和の緩衝溶液(CO₃-2 0.2モル)中の60%PCA。

実施例45：手動式プレスを用いる圧縮前駆物質

この実施例は、手動式プレスを用いるペレットの製造方法を示す。

Perkin Elmerクイックプレスを用いる。直径7mmのペレットを、選択したダイセットをクイックプレスと共に用いて作製した。他の様々な直径のダイセットを所望の測定に依って用いることもできる。このペレットの表面は、型の形状に依って、平らか又は丸くてよい。この試料を選択したダイ型に載せる。試料の量が増す程、ペレットの厚みも増す。次に、基準位置を、クイックプレスの上部にセットされた種々の手動位置から選択する。このダイセットをクイックプレス中の位置に置く。このクイックプレスのハンドルに選択した時間にわたって定常的圧力を加える。一度その時間が経過したならば、底のキャップをダイセットから取り外し、ペレットをダイセットから排出するためにダイの上部に圧力を加えることによりペレットを型から取り出す。

ロットAB971002からのABの0.08gの試料(ID:ABcom3)を7mmの直径のダイセット中に調整した。クイックプレスの手動位置を20にセ

ットし、1分間圧縮した。その結果生成したペレットは、7mmの直径と1.5mmの高さを有し；密度は、1.39g/cm³。ロットAB971002からのABの第2の1gの試料(ID:ABcom4)を7mmの直径のダイ中に調整し

た。手動位置を20にセットし、30秒間クイックプレスにて圧縮した。その結果、7.0mmの直径と2.0mmの高さを有するペレットが形成され；密度は、 1.23 g/cm^3 であった。

実施例46：種々の培地を有するPCAペレットの性質

この実施例は、種々の培地におけるPCAリン酸カルシウムペレットの性質を記載する。

4種類の選択した培地は：(-MEM(最小必須培地)；TBS(トリスウシ血清：50mMのトリス+150mMのNaCl)；(-MEM+FB(ウシ胎児血清10%)；及び完全培地(37℃でのTBS中での2時間の浸漬及びその後の(-MEM+FB)中への浸漬)であった。

混合した前駆物質ACP及びDCPDの0.3gの試料を、Carverラボラトリープレスを用いて、1分間、7トンで圧縮した。その結果生成したペレットは、12mmの直径と1mmの高さを有した。このペレットを、10mlの37℃の蒸留水に30分間入れた。インキュベーション後、そのペレットを、6mlの種々の培地に37℃で24時間及び48時間にわたって入れた。

混合した前駆物質ACP及びDCPDの第2の1gの試料を、0.8mlの蒸留水と合わせた。この混合物を、回転させて大丸薬とし、10mlの蒸留水中に落とした(37℃、30分間)。次いで、この大丸薬を、乳鉢と乳棒を用いて粉碎して微粉を得た。この粉末を、Carverラボラトリープレスを用いて、1分間、7トンで加圧した。その結果生成したペレットは、12mmの直径と1mmの高さを有した。このペレットを、次いで、種々の培地に、37℃で、24及び48時間にわたって入れた。

この培地溶液のpHを、37℃でのインキュベーションの後に、0、24及び48時間の種々の時点において測定した(25℃)。この研究の結果を表9に示す。

表9 溶液のpH

試料 標品	α -MEM			TBS			α -MEM+FBS			完全		
	0h	24h	48h	0h	24h	48h	0h	24h	48h	0h	24h	48h
a	7.6	8.1	7.9	7.5	7.0	6.8	7.5	7.7	8.2	7.6	7.9	7.9
b	7.3	7.3	7.1	7.3	6.5	6.0	7.4	7.5	7.5	7.5	7.5	7.3

実施例47：反応性前駆物質、凍結乾燥、粉碎、圧縮

この実施例は、どのようにしてPCAリン酸カルシウムペーストからペレットを形成するかを説明する。

PCAは、ACP及びDCPDを促進剤として用いて作製する。塩溶液を生理学的に適当な水性媒質として用いる。調整したPCAペーストを、次いで、イン・ビトロで37℃で固化させ、その後、凍結乾燥する。固化したPCA物質を、次いで、手で粉碎する。一度粉碎したならば、このPCA物質を、実施例34及び35に記載の方法によってペレットに形成する。

実施例48：形作り、固化、粉碎を伴わない凍結乾燥

この実施例は、どのようにしてPCAリン酸カルシウムペーストからペレットを形成するかを示す。

ACP及びDCPDを前駆物質として選択する。適当量の塩溶液を用いてPCAペーストを作製する。このPCAペーストを所望の形態に形作る。それを、次いで、37℃で、イン・ビトロで30分間インキュベートする。この固化した物体を、次いで、凍結乾燥する。

実施例49：これらの方法を比較するイン・ビボ実験

この実施例は、これらのペレットを生成する方法をイン・ビボ実験により比較する。

ペレットを実施例32に従って作製する。2つのペレットをイヌの大腿骨中に移植する。これらの動物を犠牲にして移植部位を、3、4及び6週目の時点に残留物質について分析する。各時点において、移植部位の石灰質除去した及びして

ないスライドを調製して染色する。これらのスライドを組織形態学的に分析して調製したペレットのPCAリン酸カルシウムペーストのそれに対する類似性を測

定する。

実施例 5.0：充填剤及び接着剤の取り込み

この実施例は、塑性流れを研究するための充填剤の利用を示す(ペレット中の引張強さの効果における該流れが特に興味深い)。

圧縮可能な糖をペレット製造に関連して充填剤として用いる。この糖を前駆物質ACP及びDCPDと1:1:1の比で圧縮前に混合する。全圧縮サイクルの持続時間及び最大圧縮力の持続時間を改変した実施例1に従って、ペレットを製造する。糖の充填剤の有効性を、それらのペレットの引張強さを比較することにより測定する。引張強さを計算するのに使う方程式は、下記の通りである：

$$\sigma_0 = 2F / \pi d t$$

(式中、 σ_0 は、引張強さであり、Fは、錠剤を開裂させるのに要する力であり、dは、ペレットの直径であり、そしてtは、錠剤の厚み又は高さである)。

実施例 5.1：ペレットでのワクチンの送達

この実施例は、どのようにしてペレットをワクチンの送達ビヒクルとして用いるのかを説明する。

スカシ貝ヘモシアニンを、リン酸緩衝塩溶液(pH 7.0)中で0.5mg/mlの濃度で調製する。この溶液の0.8mlを、1gの活性化ACPとDCPDとの1:1混合物に加えて、パテ中に混合する。この調製したPCAパテを、次いで、凍結乾燥する。この乾燥物質を、SPEX 8505アルミナセラミック粉碎チャンバーを備えたSPEX 8510ラボラトリーミルを用いて、10分間粉碎して粉末にする。この粉末化PCAを、次いで、実施例3.2に記載のようにペレットに調製する。実施例3.2により形成したペレットを、ラットの皮下に移植する。このプロセスを、月ベースで、4ヶ月間繰り返す。血液試料を定期的に採取し、抗スカシ貝抗体力価をELISAにより測定する。

実施例 5.2：イヌの前腰部椎体間融合。この実施例は、イヌの脊椎骨の融合におけるPCAリン酸カルシウムの利用を記載する。

動物を実施例2.6に記載のように麻酔し、右側臥床姿勢にし、前部正中線から後部正中線までの体毛(中胸部から骨盤まで及ぶ)を剃った。無菌の準備及び布を

かけた後に、前腰部脊椎への後腹膜腔からの到達法(L3～L6椎骨の露出を伴う)を行った。L4及びL5上に重なる分節血管を結紮して分離し、L3～4、L4～5及びL5～6椎間板の前外側露出を可能にした。前部椎間板切除術を平行対刃の振動鋸(Aesculap)を用いて行った(平行に調整した終板を伴い及び出血軟骨下骨に至る各レベルで)。椎間板切除術の後に、PCAリン酸カルシウム若しくは自己の骨を含むチタン製の円柱状ケージ又は未充填ケージを各椎間板スペースに挿入した。自原性の腸骨稜移植片は、ケージへの詰め込み及び椎間板スペースへの挿入の直前に別の切開により左前腸骨稜から採取した。3つのケージすべてを挿入した後に、4.5mmの椎体らせん及び6mmの直径のL3～L6の縦のロッドを用いて内部固定を適用した。次いで、腹部の傷及び腸骨稜移植部位を、吸収可能な縫合糸及び皮膚ステープルを用いて、層状に閉じた。

2及び12週後に、イヌを犠牲にして、石灰質除去していない切片の組織学を、新たな骨の成長及び椎骨の融合について調べる。移植物の視覚的検査では、この発明のPCAリン酸カルシウムを用いた脊髄が融合して見えた。

実施例53：PCA物質の存在時の骨の治癒

この研究の目的は、この発明のPCA物質の存在下での骨の治癒を調べることであった。

この研究のために、30匹の成体のNZWウサギを用いた。生水及び認定されたウサギ用食物のペレットを、研究の過程を通して、無制限に与えた。外科手術の手順は、完全麻酔と無菌的条件下で行った。次いで、セファゾリンを、外科手術の30分前に投与した(22mg/kg)。麻酔は、10ml(100mg/ml)のケタミン、1ml(100mg/ml)のキシラジン及び5mlの0.9%生理食塩水よりなった(87.5mg/kgのケタミン、8.75mg/kgのキシラジン)。この麻酔用カタテルを、1.4ml/kg i.m.の投与レベルで与え

た。次いで、動物の後肢の毛を刈り取り、ベタディン外科用溶液とアルコールで洗った。外科手術の前に、動物が適当に麻酔されていることを確認するべめに監視した。これをするために、足跡に圧力を加えた。動物が反応しなくなったなら

ば、更なる麻酔を停止した。この手順の間中、その動物を、ひげのひきつりについて監視した(これは、この動物の意識の回復を示す)。無菌技術を用いて、近位脛骨上に切開を行った。軟組織を一方にそらせて骨を露出させた。低速の8mmの穿孔器歯科用ハンドピースを、必要なだけの灌注(0.9%生理食塩水)に用いた。骨質ディスクを切り分けて遊離させ、次いで、その部位を移植用に準備した。次いで、PCA物質をこの欠損中に配置した。軟組織を重ねて3-0Dexon™縫合材料を用いて閉じた。この方法を用いて、動物一匹当たり一の試料を行った。これらの動物を監視し、起床時にブプレノルフィン(0.02~0.05mg/kg、s.c.)及び広いスペクトルの抗生物質を与えた。手術後3日間にわたって、鎮痛薬と抗生物質を1日2回投与した。各動物から、安楽死前に、血液を吸い出した。血液を吸い出すために用いた方法は、下記の通りである：各動物にアセプロマジン(1mg/kg s.c.)を与えてリラックスさせ、血液を吸い出す前に血管を約15~20分間膨張させた。次に、23gのバタフライ針を中央耳動脈中に入れた。

2ccのガラス管をセットしたバキューターを用いて、動物から2ml以下の血液を吸い出した。血液を吸い出した後にこの針を取り出し、血管に圧力を加えて適当な凝固をさせた。更に、動物が完全麻酔下にある手術中に筋肉内注射を行った。次いで、軟組織の毛を剃って、タイプ10.0PCA物質の注射の準備をした。腰の筋肉への3~5回の注射を、16ゲージの皮下注射用の針を用いて行った。4、7及び14日目の時点で、ウサギに4回又は5回の注射をして、化学分析用にPCA物質を回収した。残りの時点は、3回の注射のみ行った。各注射は、約0.2グラムのPCA物質を含んだ。対側性側において、陽性対照として働く再吸収可能な縫合材料の3回の注射を行った。これらの動物を、ペントバルビタールナトリウム静注による麻酔とその後の腋窩動脈の切開による放血により安楽死させた。FTIR及びXRD分析用に、PCA物質を軟組織の移植部位から取り出し、イソペンタン中で急速冷凍して、ETEX社へ氷上にて発送する

まで、-70℃に保存した。軟組織及び硬い組織の試験部位を、組織学用に取り出して調製した。

安楽死及び放血後に、組織を動物から取り出して、組織病理学用切片用に、パラフィンに包埋し、切片に切って、ヘマトキシリン及びエオシンで染色した。次に、300mgの回収したPCA物質を、1997年1月22日に、マサチューセッツ州CambridgeのMassachusetts Institute of TechnologyのCenter for Materials Science and Engineering facilitiesにおいて、Rigaku RU300回転アノードX線回折計で分析した。300mgのKBrと1.5mgの回収したPCA物質との均質な混合物をSpectrum 1000 Perkin Elmer FTIRにより分析した。又、組織切片を、骨内の骨形成について、0～+3のスケールで採点評価した。好中球の浸潤のある領域は、一般に、殆ど骨原性細胞又は新たな骨形成はなかった。0～+3のスケール(0は新しい骨内の骨形成がないことであり、+3は大規模な新たな骨内骨形成があることである)において、4日目では動物は、0～+1であり、7日目では、+1、そして14日目では、+2を有した。

4日目及び7日目において、欠損部位上に可視的な僅かな膨潤があった。14日目の肉眼的所見は、ドリル部位上のドーム形状の骨質カルスの発達を示した。すべての試験群について、欠損部位における骨質カルスの増大した成熟(21日目に評価したとき)があったが、残りの皮層上には如何なる有意の骨膜反応もなかった。顕微鏡観察により、欠損部位は、小柱骨及び皮層骨で満たされていた。中位の量の骨内小柱骨形成がPCA物質の周囲にあり且つ該物質内へ及んでいた。21日目には、移植PCA物質に対する如何なる有害な反応を示すものもなかった。試料を、4、7及び14日目に回収して、XRDを用いて分析した。図__を参照されたい。これらのスペクトルは、次のことを確実にした：PCA物質の結晶構造は、イン・ビボで少なくとも14日間にわたって安定であり、イン・ビボで製造されたPCA物質と実質的に同じである。更に、試料を動物から、4、7及び14日目に回収して、FTIRにより分析した。図__を参照されたい。この試験物質は、化学的に安定であり、反応は、イン・ビボで完結した。PCA物質は、筋肉中又は骨の欠損部位に移植された際に、許容できない炎症応答を引き起こさなかった。XRD及びFTIR分析により、PCA物質は、イン・ビボで、

移植後最長で21日間化学的に安定であることが測定された。

実施例54：PCA物質を用いる骨の治癒の定量

この研究の目的は、この発明のPCAの存在下での骨の治癒を定量すること、及び移植したPCA物質の再吸収を監視することであった。

プロトコールを、1996年2月14日に採用し、研究を、カナダ国ケベック州、Senneville Rd., 87のBio-Research Laboratory Ltd.にて、米国FDA Good Laboratory Practice Regulations(21 CFR Part 58)に従ってH9X3R3で行った。外科手術を、1996年2月15、16、22、23、29日及び3月(6ヶ月間の研究)及び1996年4月11及び12日(1年間の研究)に行った。

ビーグル犬(イヌ科)を、米国、メリーランド州49009 Kalamazoo, South 6th Street, 6322, HRP Inc.より得た。これらのイヌを、4つの別々の部屋のバー型床及び自動給水バルブを備えたステンレス鋼製のケージに個体ごとに収容した。すべての動物は、標準的な認定されたペレット状の市販のドッグフード(400g—PMI認定Dog Chow 5007: PMI Feeds Inc.)を毎日1回摂取し、ボールをほぼ24時間ケージ内に置いておいた(示した手順の期間を除く)。更に、何匹かの動物は、ときどき、缶詰食品、Mixit又はCanine ID(Hill's Science Diet)の補足の食餌を与えられた。市営水道水を無制限に与えた。

PCA物質を、予備測定したパッケージ中の無菌粉末として供給した。この物質を、移植手術の日に調製した。この物質を、適当量の無菌水で水和し、移植まで室温で覆いをして保存した。各々のイヌに一定投与量のPenlong-XL(ベンザチンペニシリンG及びプロカインペニシリンG)(1mL)を、手術の少なくとも1時間前に及び手術の2日後に筋肉内投与した。各々の動物を、AC-ブロマジン(0.05mg/kg)、ブトルファノール(0.2mg/kg)及びグリコピロレート(0.01mg/kg)の筋肉注射により、予備外科手術の準備の少なくとも10分前に予備麻酔した。次いで、これらの動物を、一方の後肢(グループ1及び2)又は両方の後肢(グループ3及び4)の骨盤から下脚までの毛を剃ることにより外科手術の準備をした。剃った領域をヒビタンTM(4%クロルヘキシジングルコネート)で洗い、その後、多量の70%イソプロパノール及びベタディン

TM(10%ポビドンイオディン)を適用した。これらの動物を、2.5%チオペントンナトリウムの静脈注射により麻酔したが、グループ2については、皮下注射部位(背中胸領域)を同様に準備した。手術前に、デュラテアズTM軟膏を各々の目に投与した。すべての動物を、手術手順中、イソフルラン麻酔下で挿管して維持した。乳酸加リンゲル液を手術中に投与した(10mL/kg/時間の速度で)。

縦方向の皮膚切開を、後肢の側面に沿って行って、約8~10cmの大腿骨を露出させた。大腿骨上の骨膜を骨から折り返した。テンプレート(寸法6cm)を骨幹の端にあけた穴にそれらの部位を確認して適用した。適当な寸法のドリルビットを用いて、約3~5mmの深さの骨片を骨幹の各末端から取り出し、振動鋸を用いて、この穴を遠位に約4~5cm延長した。骨髓を取り出して任意の有意の出血を適当に制御した。グループ1の動物については、欠損部位を創った後に、取り出した骨を小片に切り、塩溶液ですすいで、その欠損部位へ自家骨適用として詰めた。グループ2の動物については、欠損部位を創った後に、骨代用物質をその欠損部位に配置し、過剰量の物質が周囲の組織に残らないことを確実にした。この手順の後に、若干のBSMTM(最大で25gの総投与量)を、背中胸領域に皮下注射した。グループ3及び4の動物の場合には、第1の後肢に欠損部位を創った後に、骨代用物質をその欠損部位に配置し、過剰量の物質が周囲の組織に残らないことを確実にした。取り出した骨を小片に切り、塩溶液ですすいだ。欠損部位を反対の後肢に創り、用意した骨をその部位に配置した。各欠損部位を一片の1mmのK-ワイヤーを溝の各末端に配置することにより印した。次いで、筋膜を再吸収可能な縫合糸を用いて縫合して閉じ、その物質がその場所に保持されることを確実にした。手術部位を、手術用ステープルで閉じ、これらのステープルを手術の約10日後に取り除いた。

グループ3の各動物の両方の後肢について、検死の日に、0週目として、及びすべての生存しているグループ3の動物について、3、12及び26週目にラジオグラフィを行った。動物に、この手順のために、鎮静剤を飲ませた。これらの動物を、ペントバルビタールナトリウムの静注による麻酔とその後の腋窩動脈の切開による放血により安楽死させた。上記の組織をパラフィンワックス中に包

埋し、切片に切ってヘマトキシリン及びエオシンで染色することにより調製した。各大腿部移植部位の半分(グループ1、2及び4)を、石灰質除去した切片として調製し、ヘマトキシリン及びエオシン及びマッソン三色染色したスライドとして調製した。各部位の残りの半分为、70%アルコール中に保持して、石灰質除去してない切片として調製し(適当な包埋媒質中)、ツェンカー液中で固定して、フォン・コッサ及びゴールドナーの三色染色法を用いて染色した。

組織病理学的分析の後に、組織形態学的分析を行った。欠損の境界を、主観的に決定し、骨の全領域及び存在するPCA物質を、欠損領域について表にした。組織形態計測は、組織病理学を確認し、拡張した。すべての利用可能な実験群についてのすべてのフォン・コッサ染色した石灰質除去してない切片からの組織形態計測データは、動物がグループ1、2又は4の何れからのものであるかによらず、移植型によって、各時点でプールした。PCA物質処理した及び自家移植片処理した欠損の両方における新たな骨の形成に関する結果並びにPCA物質再吸収を、図__に与える。自家移植片のレシピエントにおける新たな骨の形成は、PCA物質レシピエントにおける新たな骨の形成の進行より僅かに進んで起きるようであった。4週目において、自家移植片レシピエントにおける新しい骨は、 $4.7\% \pm 2.0$ (sem; n=8)のほぼ最大値に達した。26週目までに、自家移植片の値は、 $56.78\% \pm 20.9$ (sem; n=4)まで減少し、これは、おそらく幾つかの移植片領域の失敗により増大した再建が起きていることを示唆している。新しい骨は、PCA物質のレシピエントにおいては、12週目までに最大値に達しなかった($77.18\% \pm 11.2$, sem; n=8)が、26週目で自家移植片に認められた見かけの再建は、PCA物質レシピエントにおいては認められなかった。26週目におけるPCA物質の値($78\% \pm 21.5$, sem; n=4)は、12週目の値に匹敵した。観察可能な残留PCA物質は、4週目までに欠損中の全表面積の95%未満に相当し、26週目までには、0.3%未満に相当する。この欠損は、元々100%PCA物質により満たされていたので、再吸収は、26週目までに99%を上回った。

他の具体例

前述は、単に、この発明のある好適な具体例の記載であり、それを限定することを意図したものではないということは、理解されよう。後述の請求の範囲は、本文及び添付の図面に記載されたこの発明の包括的及び特異的な特徴のすべてをカバーしている。

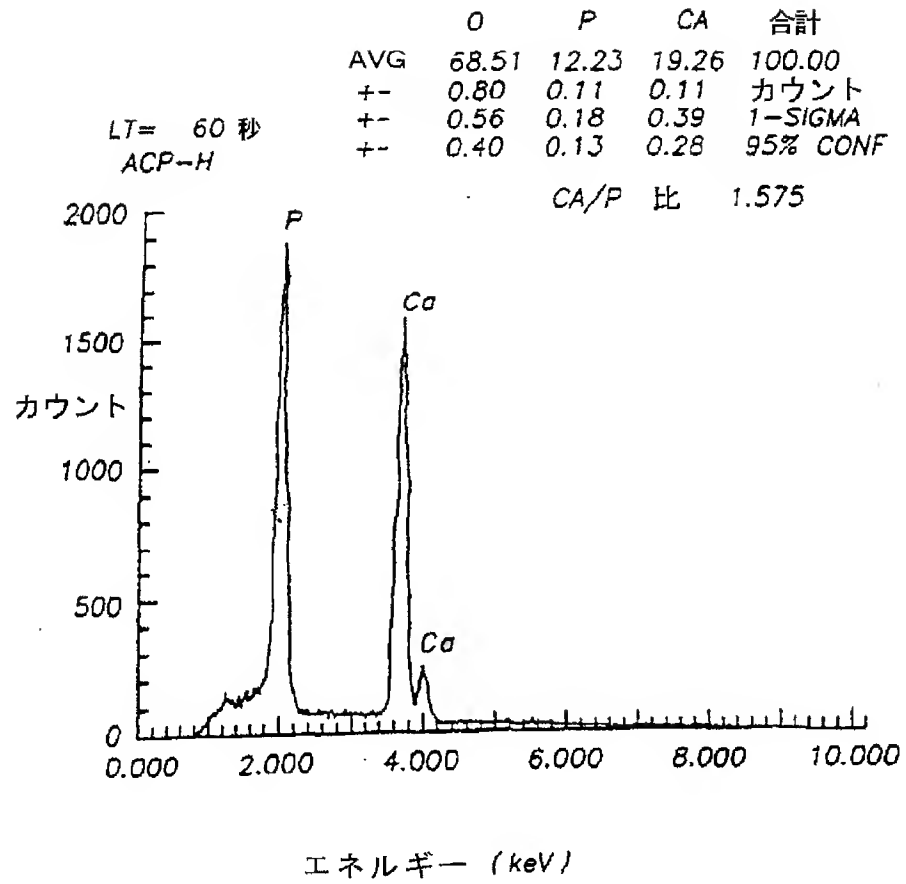
【図1】

FIG. 1



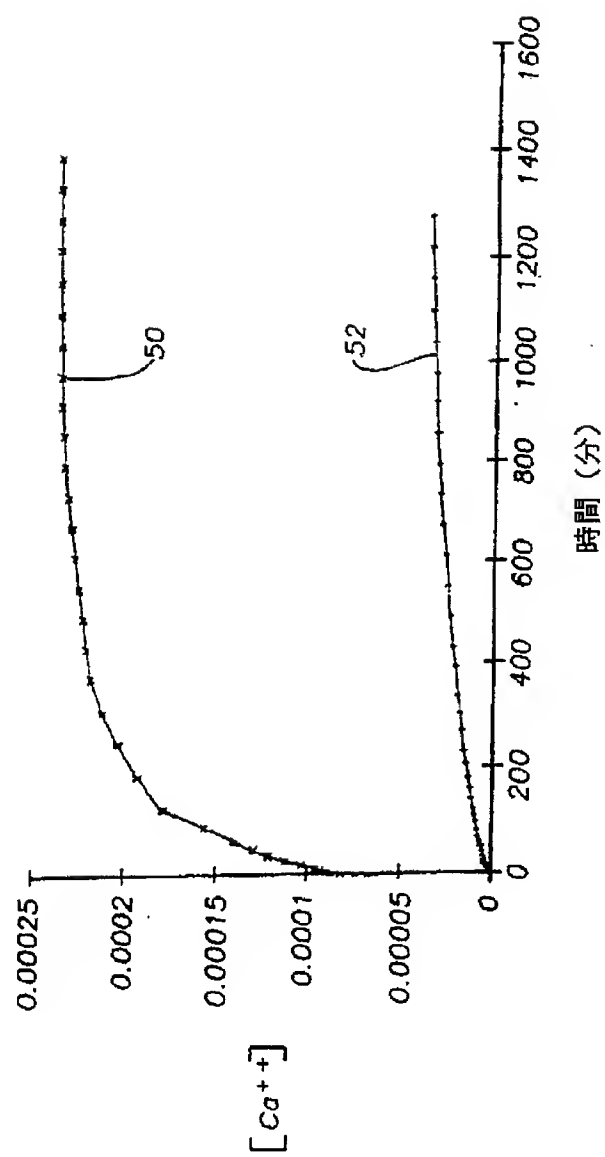
【図2】

FIG. 2



【図3】

FIG. 3
37°Cのトリス緩衝液 (pH 7.3) 中での溶解
200ml 溶液中の40mg 粉末



【図4】

FIG. 4

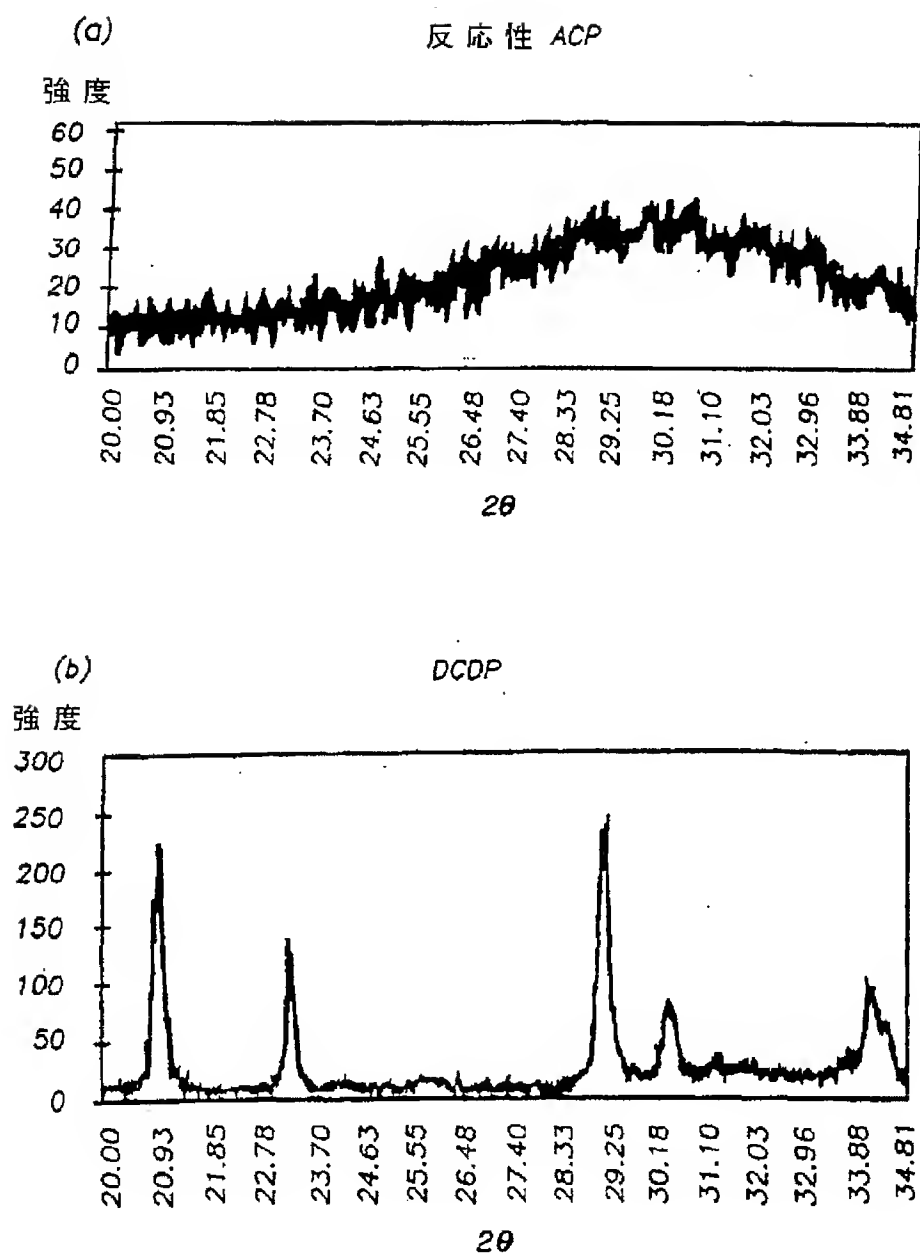
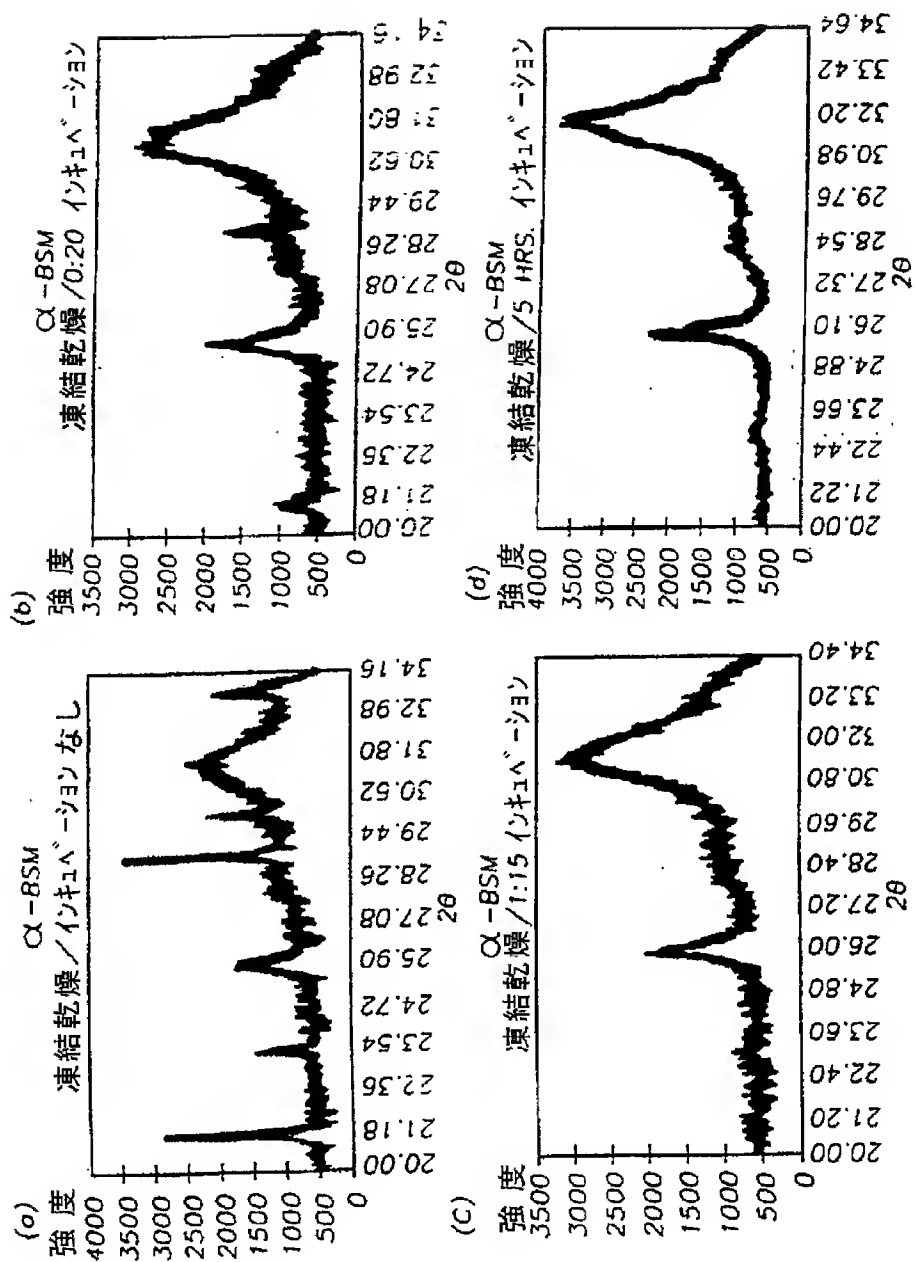


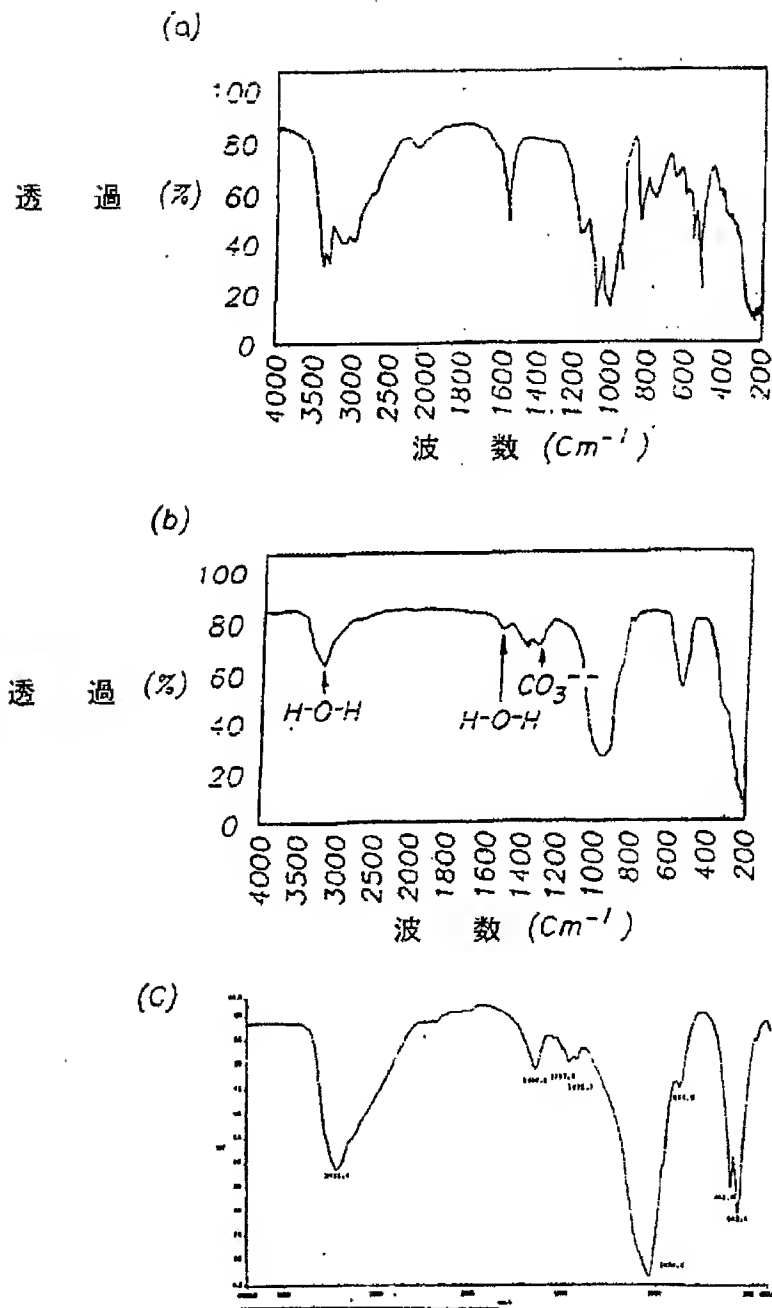
FIG. 5

【図5】



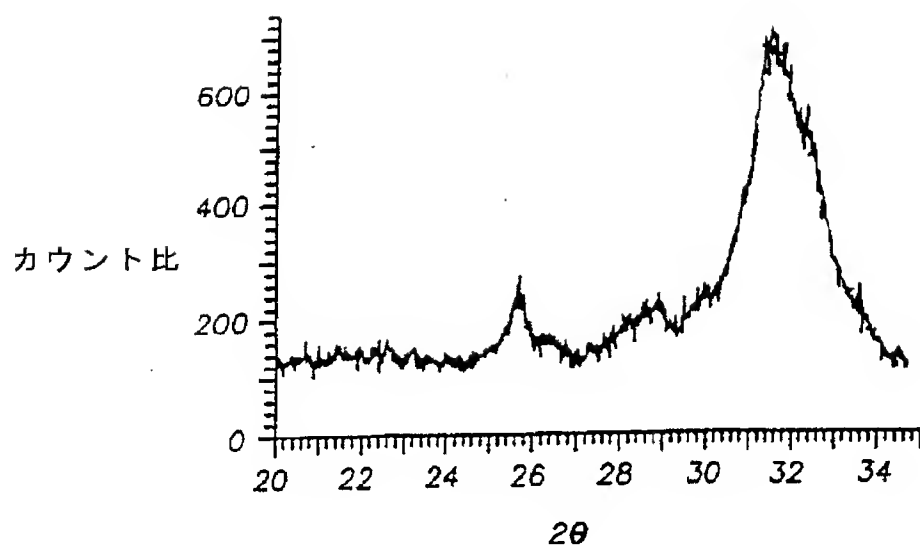
【図6】

FIG. 6



【図7】

F I G . 7



【図8】

粉末「B」の粒度に対する%

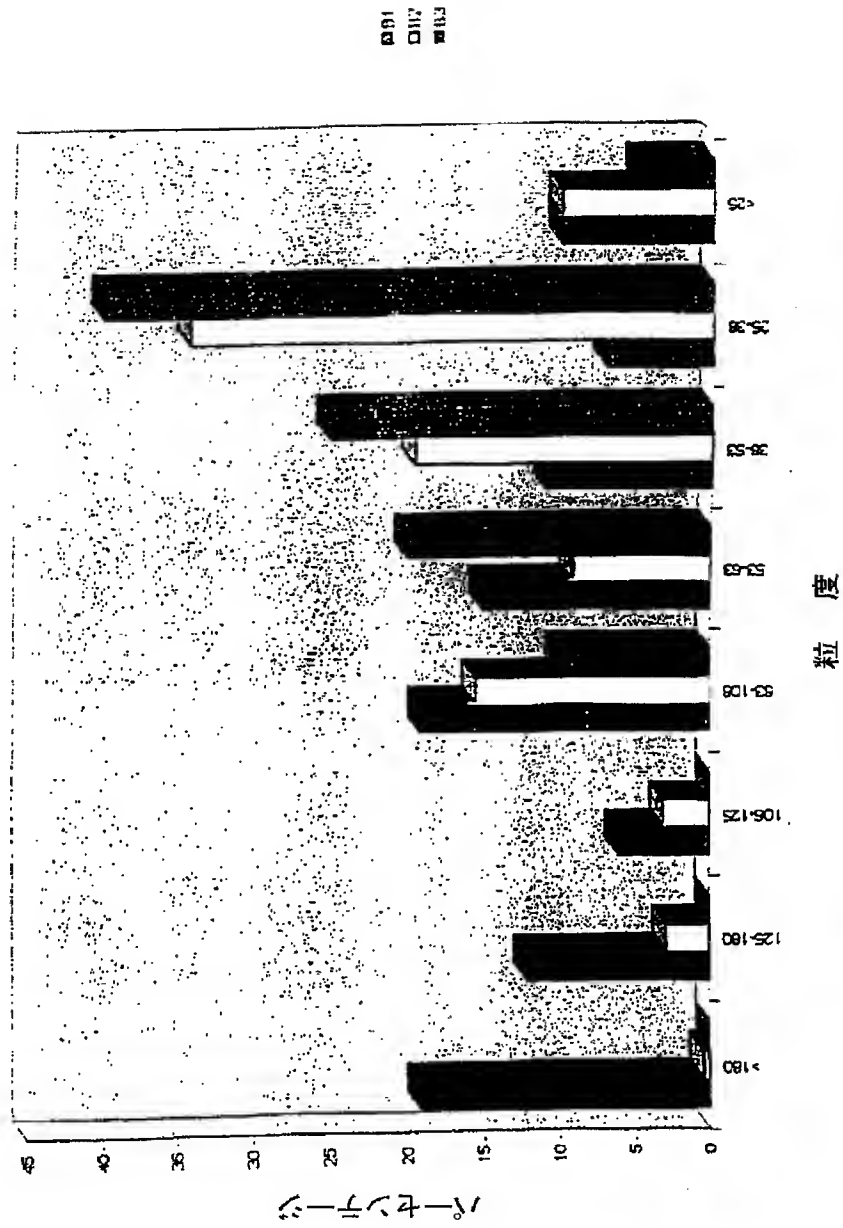


FIG. 8

【図9】

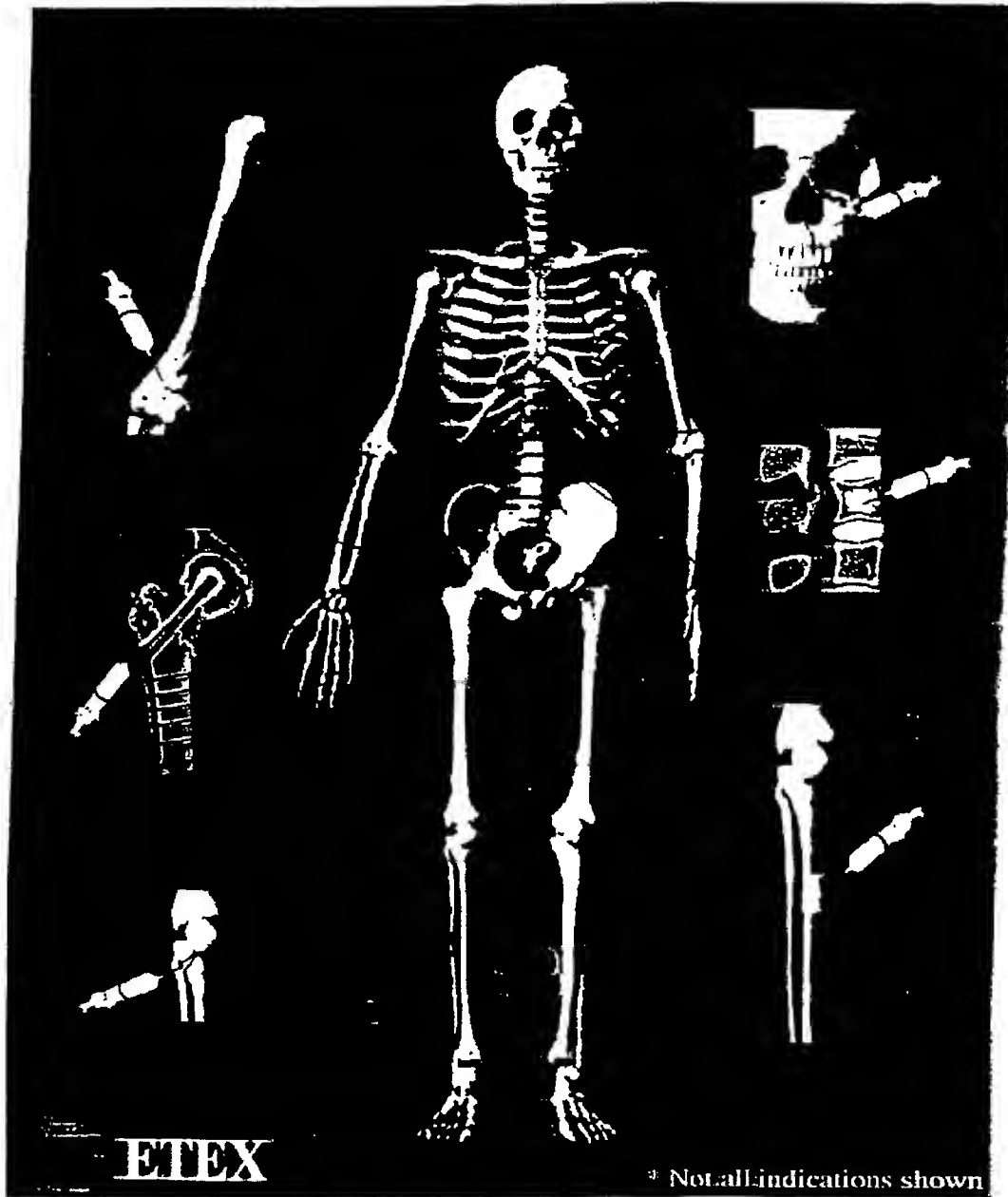


FIG 9

【図10】

研究 EX96-1-002

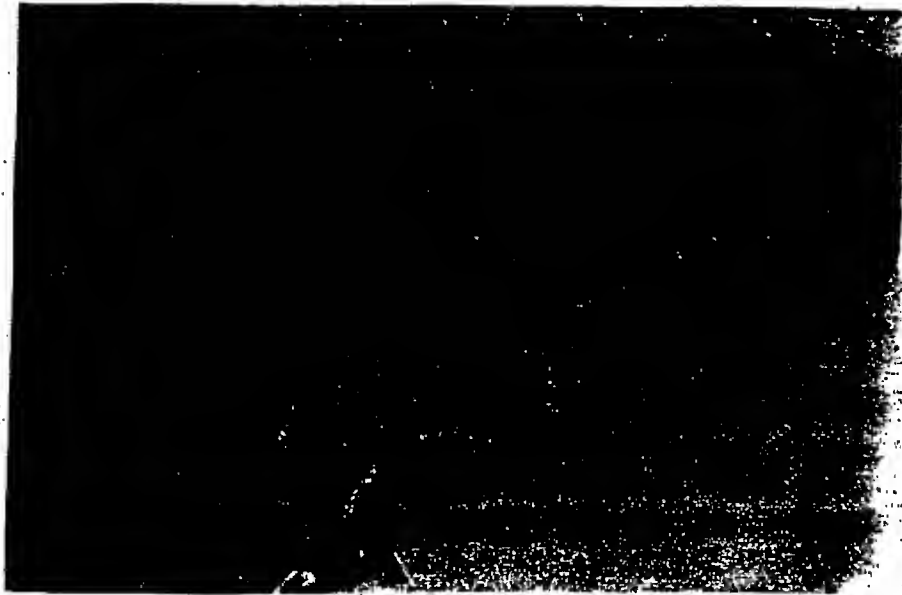
N Z W ウサギ 近位 脛骨 欠損モデルにおける骨代
用物質 (BSM) のスクリーニングアッセイ

Photomicrograph of Unvested control rabbit #12 to a defect. (Leave at 100x). The small arrows indicate the edge of the treated defect. The large arrowhead is at the yet unfused defect. Bone present to the right of the defect edge is the trabecular bone. Magnification: 100x.

F I G . 1 0 a

【図10】

研究 EX96-1-002

N Z W ウサギ近位脛骨欠損モデルにおける骨代
用物質(BSM)のスクリーニングアッセイ

Photomicrograph of a bone defect treated with BSM from rabbit 271, 12 weeks after surgery. Large arrowheads denote the edge of the defect. New bone to the right of the defect edge is irregular trabecular bone. Magnification 4X. Stained with hematoxylin and eosin.

F I G . 1 0 b

【図11】

研究 EX95-1-004

イヌの近位脛骨欠損モデルにおける骨代用物質
(BSM)のパイロット効力の研究

BSMで処理した欠損部位内に成長したイヌの小柱骨の顕微鏡写真。小さい矢印は骨片を裏打ちする骨芽様細胞を示しており、増大された細胞活性を示している。
(倍率10倍 石灰質除去したヘマトキシリン及びエオシン染色)

FIG. 11

【図12】

研究 EX95-1-004

イヌの近位脛骨欠損モデルにおける骨代用物質
(BSM)のパイロット効力の研究

BSMで処理したイヌの皮層骨欠損の顕微鏡写真。大きい矢印は欠損の一つのエッジを示している。この新しい骨の成長は欠損の右側にあり、手術後4週間でこの成長は厚い小柱骨になっている。(倍率4倍 石灰質除去してない黄緑色塩基性フクシン染色)

FIG. 12

【図13】

研究 EX95-1-005

N Z W ウサギ近位脛骨欠損モデルにおける骨代
用物質(BSM)のスクリーニングアッセイの確立

ウサギ#31の未処理の脛骨欠損(対照)の手術後4週目の顕微鏡写真。
大きい矢印は欠損の縁を示している。小さい矢印は骨を伴わない残りの
欠損を示す。小さい矢印は欠損部位における豊富な繊維性結合組織
を示している。大きい矢印はこの欠損における新しい小柱骨を示して
いる。(倍率4倍 石灰質除去したマッソン三色染色)

F I G. 1 3 a

【図13】

研究 EX95-1-005

NZWウサギ近位脛骨欠損モデルにおける骨代
用物質(BSM)のスクリーニングアッセイの確立

Photomicrograph of a bone defect from rabbit model treated with BSM at 4 weeks after surgery.
The large area at the top is the edge of the defect. The demarcation lines indicate the
integrated bone graft into the defect site. Magnification: 400x (reduced 10x).

FIG. 13b

【図14】



Fig. 14

【図15】

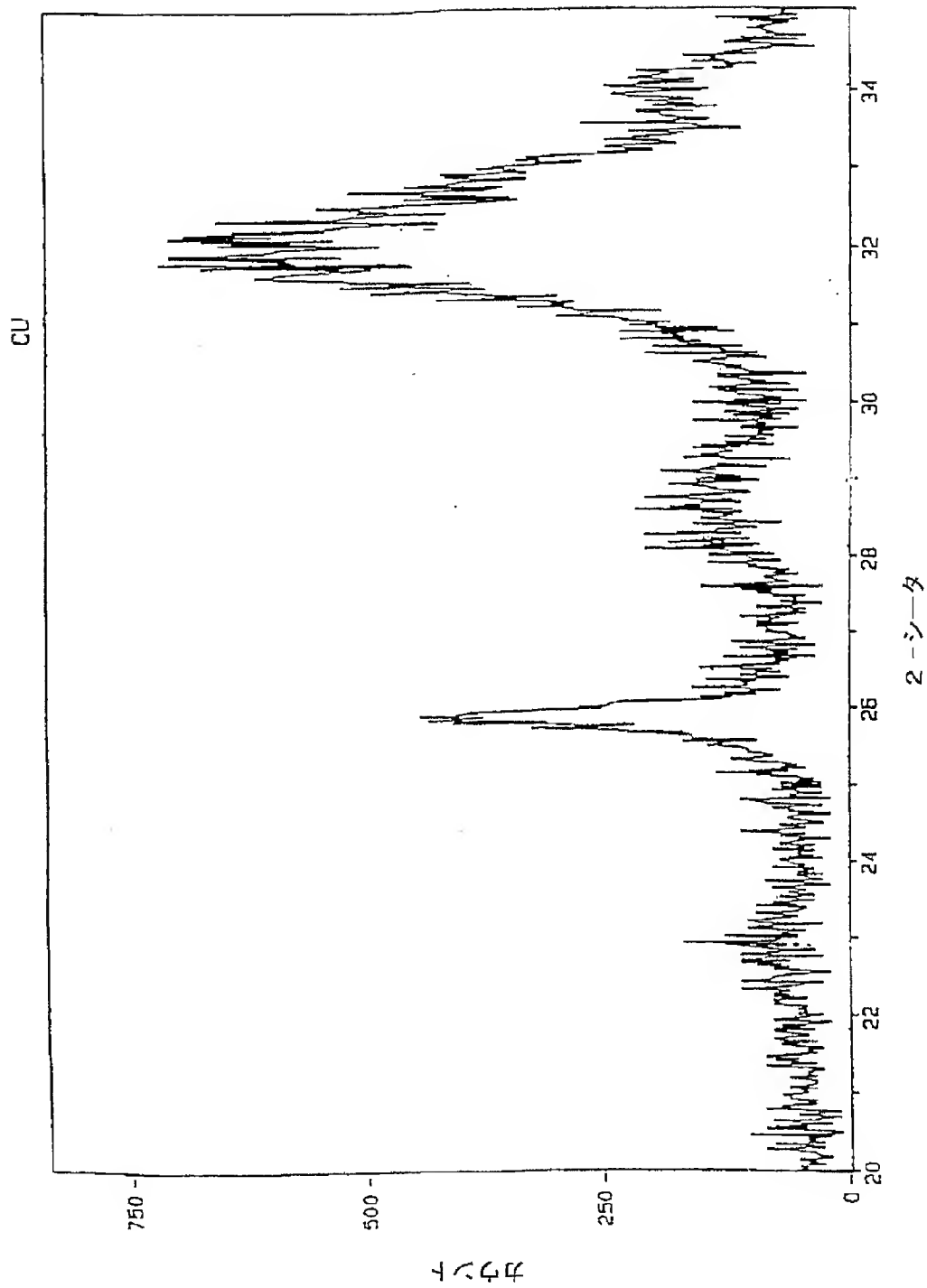


FIG. 15

【図16】

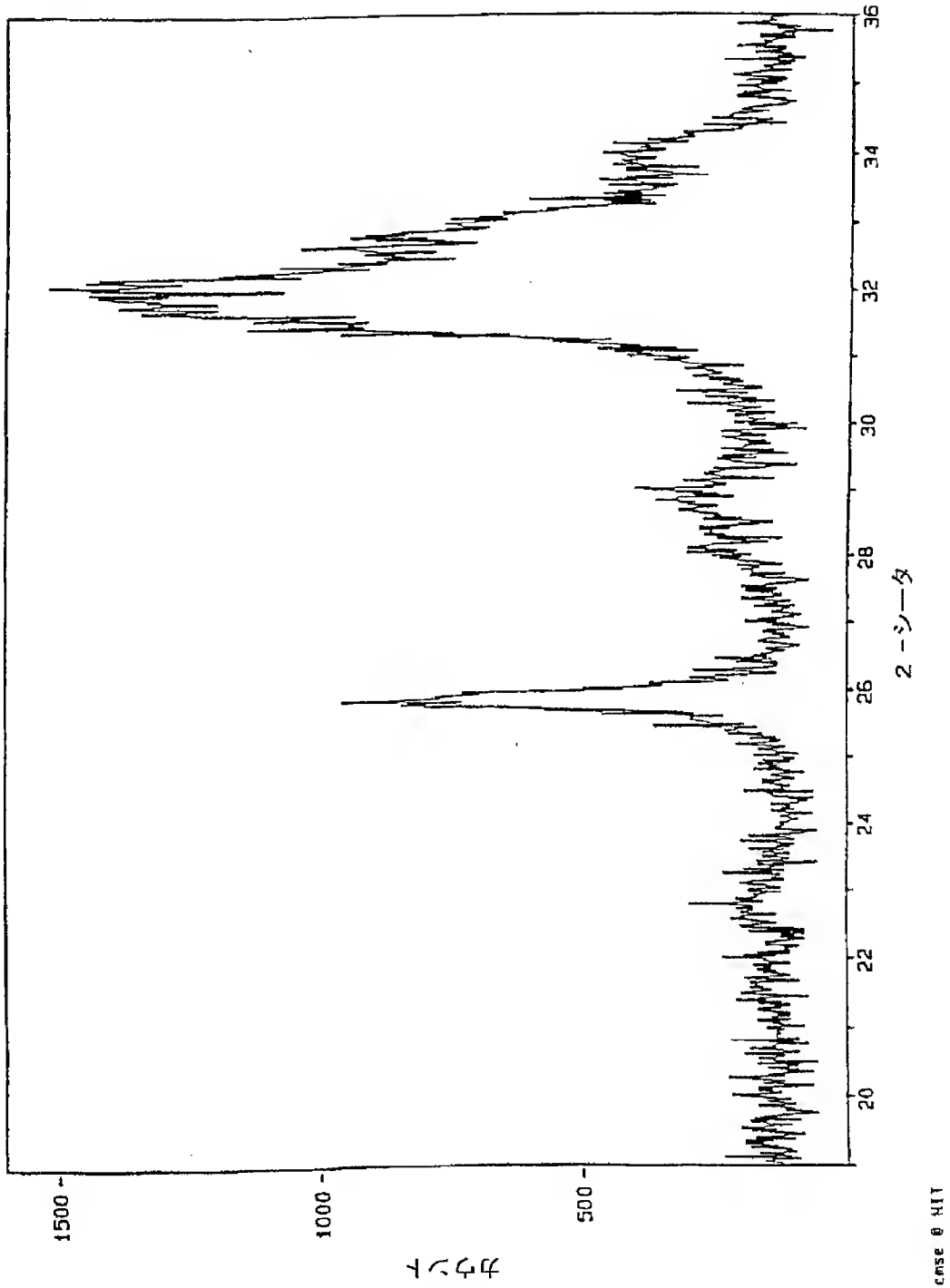
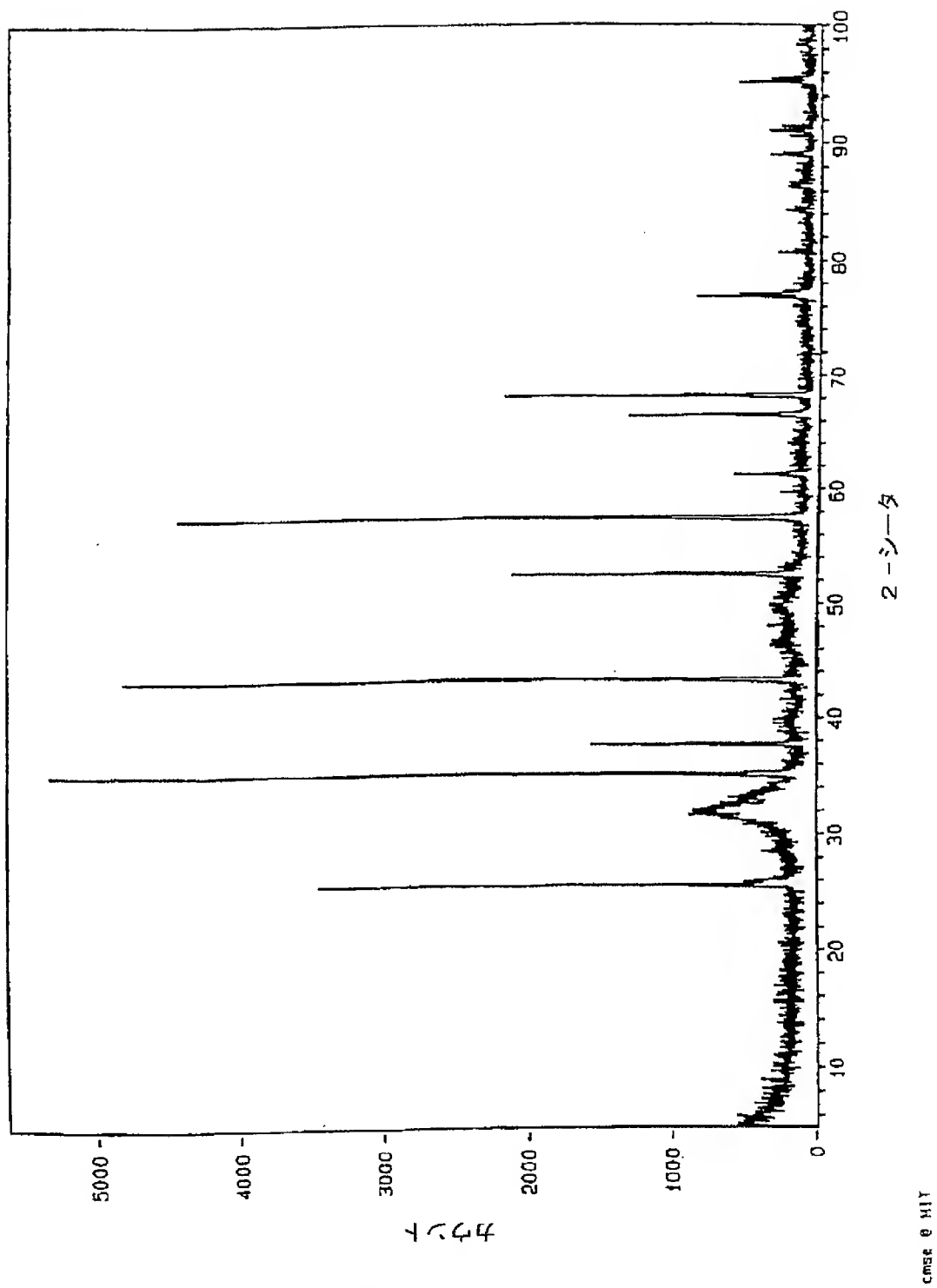


FIG. 16

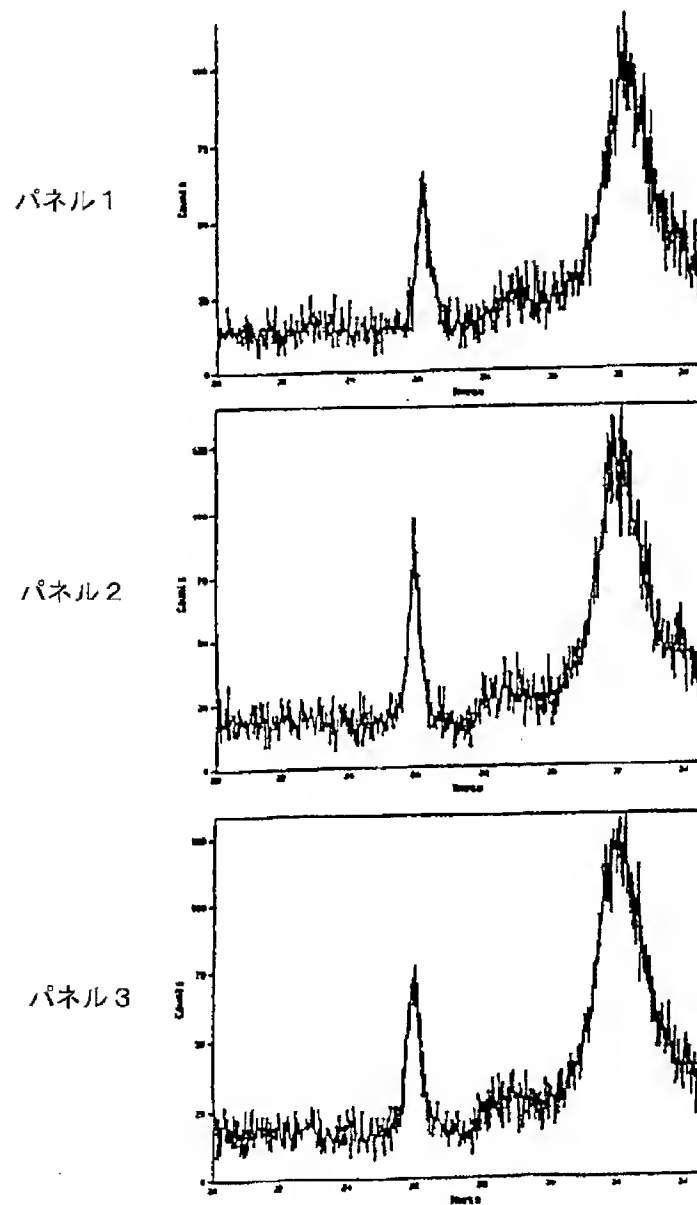
【図17】



【図18】

ETEX Co., Confidential Report
Study 96-008

外植した α -BSM™ の4、7、14日目におけるXRD分析



a:/Rabbit Study Kathleen Disk

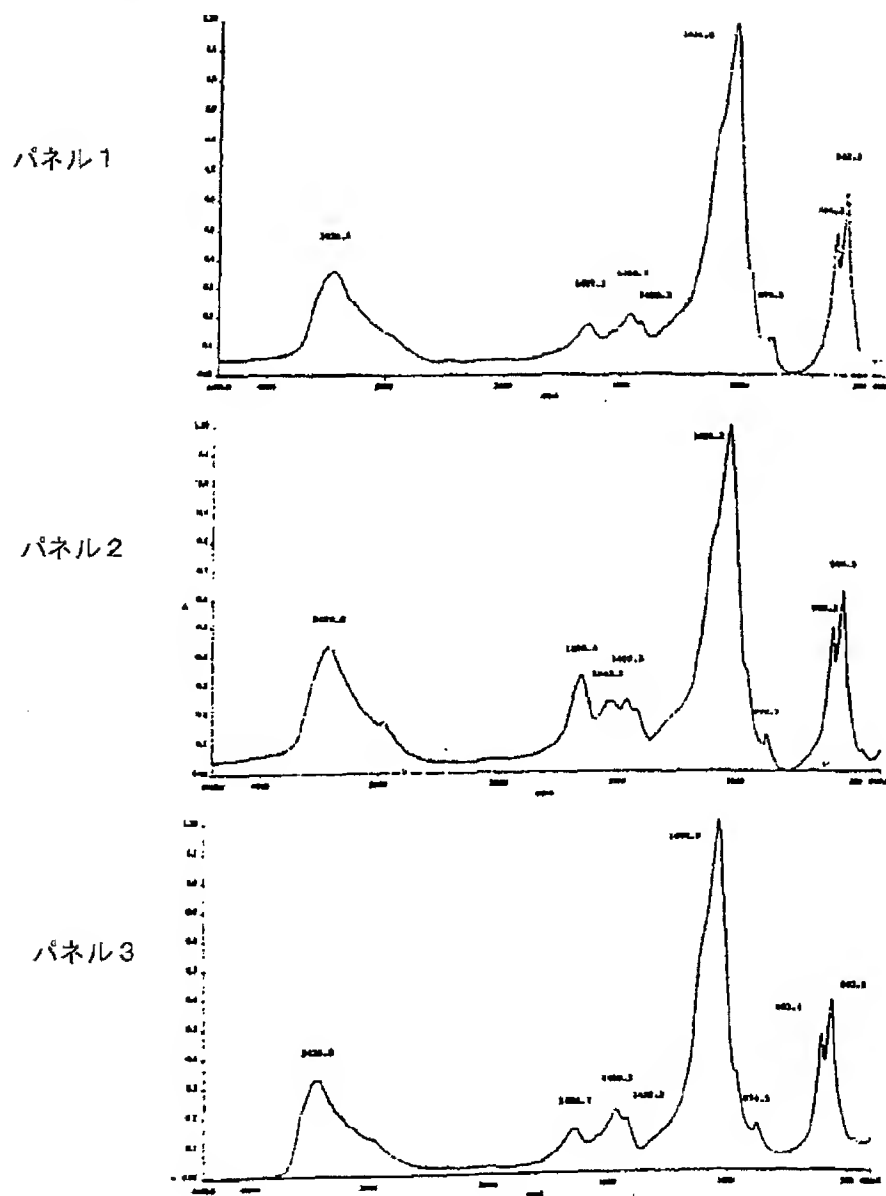
A3

FIG. 18

【図19】

ETEX Confidential Report
Study 90-08

外植した α -BSM™ の4、7、14日目におけるFTIR分析



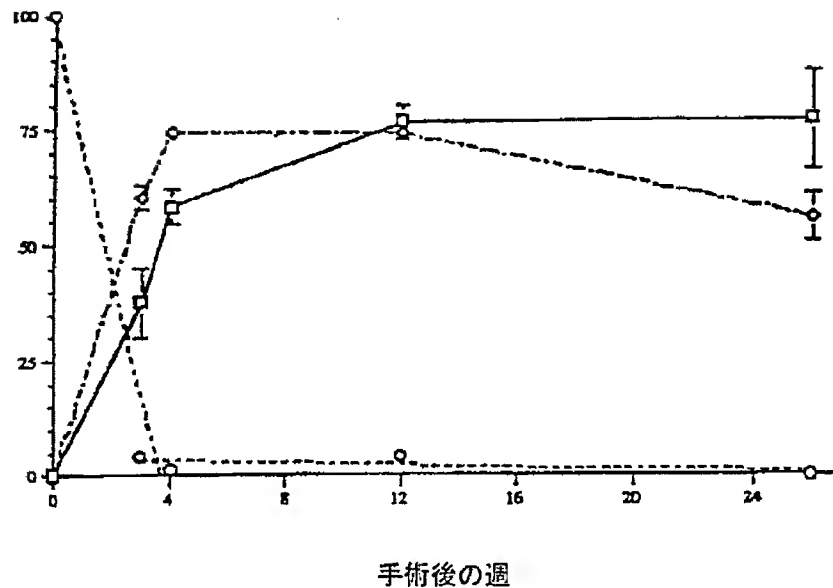
a/Rabbit Study Kathleen Disk

A2

FIG. 19

【図20】

自家移植片の治癒と比較した α -BSMTM の
再吸収及び欠損の治癒



この図はイヌの大腿骨欠損中への移植後の α -BSMTM (丸印) の再吸収を示している。 α -BSMTM (四角形) 又は自己の骨 (菱形) で処理した動物について、欠損中の新たな骨の形成も示してある。このデータはフォン・コッサ染色した石灰質除去してない切片の光学顕微鏡による組織形態学により測定して、欠損中に占めるリン酸カルシウムの% (新しい骨又は α -BSMTM) として提供する。誤差バーは平均値の標準誤差を表す。3週目及び26週目は $n=4$ であり；4週目及び12週目は $n=8$ である。

F I G. 20

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US 97/18528

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 A61K9/00 A61K9/20		
According to International Patent Classification (IPC) onto both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
Y	DATABASE WPI Week 9551 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 95-400581 '51! XP002072848 see abstract & JP 07 277 712 A (HOKKAIDO SOGO GIJUTSU KENKYUSHO KK) 24 October 1995 ---	1, 10, 11, 16, 18, 20-51
Y	DATABASE WPI Week 8825 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 88-172741 '14! XP002072849 see abstract & JP 63 111 875 A (KYOCERA CORP..JP) 17 May 1988 --- -/--	1, 10, 11, 16, 18, 20-51
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C		
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex		
* Special categories of cited documents "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
30 July 1998		13/08/1998
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 840-2040, Tx. 31 851 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Scarponi, U

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In: International Application No
PCT/US 97/18528

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 268 463 A (UNIVERSITY OF DAYTON,U.S.A.) 25 May 1988 see claims see page 3, line 40 - page 4, line 29 ---	1,10,11, 16,18, 20-51
Y	WO 92 00109 A (ORION-YHTYMÄ OY,FI) 9 January 1992 see the whole document ---	1,10,11, 16,18, 20-51
Y	WO 94 20064 A (AMERICAN DENTAL ASSOCIATION HEALTH FOUNDATION,U.S.A.) 15 September 1994 see claims ---	1,10,11, 16,18, 20-51
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 127, no. 12, 22 September 1997 Columbus, Ohio, US; abstract no. 166731, XP002072846 see abstract & C. REY ET AL.: "CHEMICAL PROPERTIES OF POORLY CRYSTALLINE APATITES" PHOSPHORUS RES. BULL., vol. 6, - 1996 pages 67-70, ---	1,10,11, 16,18, 20,51
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 121, no. 24, 12 December 1994 Columbus, Ohio, US; abstract no. 286644, XP002072847 see abstract & JP 06 228 011 A (OTSUKA MAKOTO,KYORITSU CERAMIC MATERIALS,STK CERAMICS LAB.,JP) 16 August 1994 -----	1,10,11, 16,18, 20-51

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 97/18528

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 102-105
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Remark: Although claim(s) 102-105
is(are) directed to a method of treatment of the human/animal
body, the search has been carried out and based on the alleged
effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such
an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 5.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all
searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment
of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report
covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is
restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 97/18528

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 268463 A	25-05-1988	US 4778471 A	18-10-1988
		CA 1297796 A	24-03-1992
		DE 3779404 A	02-07-1992
WO 9200109 A	09-01-1992	GB 2245559 A	08-01-1992
		AT 161737 T	15-01-1998
		AU 652945 B	15-09-1994
		AU 8082391 A	23-01-1992
		DE 69128621 D	12-02-1998
		DE 69128621 T	07-05-1998
		EP 0536179 A	14-04-1993
		FI 925845 A	23-12-1992
		HU 64214 A	28-12-1993
		PL 166849 B	30-06-1995
		PL 166919 B	31-07-1995
		PT 98080 A	30-04-1992
		SK 377792 A	05-01-1995
		US 5762950 A	09-06-1998
WO 9420064 A	15-09-1994	US 5522893 A	04-06-1996
		AU 684722 B	08-01-1998
		AU 4923993 A	26-09-1994
		BR 9307825 A	14-11-1995
		CA 2157890 A	15-09-1994
		EP 0688202 A	27-12-1995
		JP 8510713 T	12-11-1996
		US 5542973 A	06-08-1996
		US 5545254 A	13-08-1996
		US 5695729 A	09-12-1997

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN

(72)発明者 アイオロバ, マライア
アメリカ合衆国 02146 マサチューセツ
ツ, プルックライン, シーウォール アベ
ニュー 123

(72)発明者 トフィギ, アリアシアー
アメリカ合衆国 02178 マサチューセツ
ツ, ベルモント, ウェイバリー ストリー
ト 204